Izražaj koštanih morfogenetskih proteina u kirurški odstranjenim presađenim bubrezima

Furić Čunko, Vesna

Doctoral thesis / Disertacija

2012

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:105:453573

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Vesna Furić Čunko

Izražaj koštanih morfogenetskih proteina u kirurški odstranjenim presađenim bubrezima

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Vesna Furić Čunko

Izražaj koštanih morfogenetskih proteina u kirurški odstranjenim presađenim bubrezima

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

Disetracija je izrađena u Klinici za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Nikolina Bašić Jukić

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc Nikolini Bašić Jukić, koja me je svojim idejama, strpljivošću i nesebičnošću u prenošenju iskustava i znanja uvela u svijet nefrologije i transplantacije bubrega.

Prof.dr.sc Petru Kesu zahvaljujem na stalnoj brizi i stručnoj potpori u cjelokupnom mom radu.

Doc. dr.sc Marijani Ćorić zahvaljujem na stručnoj pomoći pri analizi patohistoloških preparata.

Posebno se zahvaljujem svom suprugu Krešimiru i sinu Martinu na razumijevanju, potpori i strpljenju u svim mojim znanstvenim djelovanjima.

Ovaj rad posvećujem roditeljima koji su me odgojili u ozračju da je znanstveni rad temelj naše budućnosti i mom bratu Ivanu koji je bio uvijek dokaz da se može više i bolje.

Sadržaj

1. UVOD ... 6
   1.1. BUBREG ... 6
      1.1.1. Anatomija bubrega ... 6
      1.1.2. Razvoj i građa bubrega ... 7
      1.1.3. Fiziologija bubrega ... 10
      1.1.4. Zatajenje bubrežne funkcije ... 12
      1.1.5. Akutno zatajenje bubrežne funkcije ... 12
      1.1.6. Kronično zatajenje bubrežne funkcije ... 14
   1.2. NADOMJEŠTANJE FUNKCIJE BUBREGA ... 20
      1.2.1. Hemodijaliza ... 20
      1.2.2. Peritonealna dijaliza ... 20
      1.2.3. Transplantacija bubrega ... 21
   1.3. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI ... 39
      1.3.1. Sinteza koštanih morfogenetskih proteina ... 39
      1.3.2. Izvanstanična regulacija ... 41
      1.3.3. Regulacija na staničnoj površini ... 43
      1.3.4. Prijenos signala ... 45
      1.3.5. BMP antagonisti ... 49
      1.3.6. BMP u razvoju bubrega ... 50
      1.3.7. BMP u razvijenim bubrezima ... 52
2. HIPOTEZA I CILJ RADA ... 54
   2.1. HIPOTEZA ... 54
   2.2. CILJ RADA ... 55
      2.2.1. Opći cilj ... 55
      2.2.2. Specifični ciljevi ... 55
3. ISPITANICI I METODE ... 56
   3.1. ISPITANICI ... 56
   3.2. Postupci ... 62
      3.2.1. Imunohistokemijsko bojanje ... 62
      3.2.2. Mikroskopiranje ... 63
      3.2.3. Etički aspekti istraživanja ... 63

3.2.4. Statistička obrada podataka 64
4. REZULTATI 65
4.1. Imunohistokemijsko bojanje 65
4.1.1. Izražaj BMPa s obzirom na duljinu trajanja presatka 66
4.1.2. BMP-2 67
4.1.3. BMP-4 69
4.1.4. BMP-6 72
4.1.5. BMP-7 74
4.2. Izražaj BMPa ovisno o kliničkoj dijagnozi koja je bila indikacija za kirurško uklanjanje 77
4.2.1. Tromboza arterije ili vene bubrega 77
4.2.2. Životno ugrožavajuća infekcija primatelja 79
4.2.3. Kronična disfunkcija presatka 81
4.3. Analiza uzoraka prema izraženosti intersticijske fibroze i tubularne atrofije 83
4.4. Specifičnost BMP-4 88
5. RASPRAVA 92
6. ZAKLJUČAK 102
7. SAŽETAK 104
8. SUMMARY 106
9. LITERATURA 108
10. POPIS KRATICA 121
11. ŽIVOTOPIS 123

1. UVOD

Bubrezi pripadaju u vitalne organe ljudskog tijela. U globalnom mortalitetu bolesti bubrega doprinose značajnim postotkom. Otkrićem dijalize moderna medicina je omogućila da zatajenje funkcije bubrega prestane biti smrtonosna bolest. Slijedeći veliki korak u produžavanju života i poboljšanju kvalitete života bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrežne funkcije bilo je presađivanje bubrega i otkriće imunosupresivnih lijekova. Daljnjim razvojem i usavršavanjem imunosupresivne terapije smanjen je broj epizoda akutnih odbacivanja presadaka, ali prosječna dužina njihove funkcije stagnira posljednjih 20 godina. Potraga za čimbenicima koji su uključeni u proces oštećenja i gubitka funkcije presatka jest i jedan od motiva istraživanja u ovoj disertaciji. Pregledom literature ustanovljeno je da za grupu koštanih morfogenetskih proteina (BMP, od eng. bone-morphogenetic proteins) koji su prisutni u bubrezima tokom embrionalnog razvoja ne postoje sustavni podaci o njihovom izražaju u transplantiranim bubrezima. U ovoj disertaciji praćen je izražaj BMP 2, BMP 4, BMP 6 i BMP 7 u normalnom tkivu bubrega i u tkivu bubrega nakon transplantacije ovisno o različitim čimbenicima kao što su dužina trajanja presatka, klinička dijagnoza koja je bila indikacija za kirurško uklanjanje ili patohistološke promjene nađene u presatku.

1.1. BUBREG

1.1.1. Anatomija bubrega

Bubrezi su parni organi oblika nalik zrnu graha. Smješteni su retroperitonealno u razini prvog lumbalnog kralješka.

Izvana je bubreg okružen vezivnom čahurom oko koje je masno tkivo. Bubrežna arterija i živci ulaze u bubreg u konkavitetu medijalnog ruba bubrega koji se zove hilus, a nastavlja se u bubrežni sinus. Bubrežni sinus je središnja velika šupljina okružena tkivom bubrega i ispunjena rahlim vezivnim tkivom koje obično sadrži puno masnog tkiva. Živci, limfne žile i ogranci bubrežne arterije i vene prolaze kroz bubrežni sinus. Na poprečnom presjeku bubrega uočava se vanjsko tamnije zrnato područje i unutarnje područje ili srž koja sadrži osam do dvadeset sržnih piramida. Osnovica piramida okrenuta je prema vanjskoj površini bubrega, a njihovi vrhovi strše

u sinus bubrega i zovu se bubrežne papile. Usporedni tračci cjevčica koji prodiru od osnovice piramida u koru zovu se sržni tračci i sastoje se od jedne ili više sabirnih cjevčica i ravnih dijelova nekoliko nefrona. Bubrežna nakapnica je ljevkasto proširenje uretera na mjestu njegovog spoja s bubregom, ona također prolazi kroz bubrežni sinus gdje se dijeli u tri cjevaste strukture koje se zovu velike bubrežne čašice. Velike bubrežne čašice se dijele u osam ili dvanaest malih bubrežnih čašica. Svaka od malih bubrežnih čašica stvara koničnu tvorbu oko bubrežne papile [1].

1.1.2. Razvoj i građa bubrega

U embrionalnom razvoju čovjeka nastaju tri različite generacije bubrega. Bubrezi se razvijaju iz intermedijarnog mezoderma, parnog tračka mezoderma koji privremeno povezuje paraksijalni mezoderm s bočnim pločama. Početkom 4. tjedna embrionalnog razvoja nastaje pronefros (predbubreg) koji je rudimentaran, nema ekskrecijsku funkciju i nestaje krajem 4. tjedna. U vrijeme isčezavanja pronefrosa iz intermediarnog mezoderma prsnog, slabinskog i križnog području zametka diferenciraju se sekretni mjehurići i kanalići mezonefrosa (prabubrega). Kanalići mezonefrosa se izdužuju, poprimaju oblik slova S i predstavljaju Bowmanovu čahuru, koja obuhvaća klupko kapilara, glomerul. Lateralni kraj kanalića završava u mezonefritičkom (Wolffovom) kanalu koji se ulijeva u kloaku. U 7. tjednu gornji dio mezonefrosa počinje propadati. Metanefros (definitivni bubreg) razvija se u 5. tjednu embrionalnog razvoja i nastaje iz dviju osnova: mokraćovodnog pupoljka i metanefrogenog tkiva. Mokraćovodni pupoljak je divertikul koji je izrastao iz donjeg dijela Wolffova kanala. On se izdužuje i urasta u metanefrogeno tkivo koje ga pokriva poput kape. Mezenhim metanefrogenog tkiva inducira proširenje završetka mokraćovodnog pupoljka iz kojeg nastaje primitivna bubrežna nakapnica (pelvis renalis). Svaka nakapnica se prodiranjem u metanefrogeno tkivo dalje račva čime nastaju veliki vrčevi. Mali vrčevi nastaju rastom i spajanjem kanalića 2., 3. i 4. reda. Kanalići 5. reda postaju sabirne cijevi koje se ulijevaju u male vrčeve i dalje se račvaju prema periferiji do 12. generacije. Na mjestu doticaja epitela mokraćovodnog pupoljka i mezenhima metanefrogenog tkiva dolazi do epitelno-mezenhimskog međudjelovanja. Stanice mezenhima izražavaju čimbenik transkripcije WT1, koji mu omogućava odgovor na indukcijsko djelovanje epitelnih stanice mokraćovodnog pupoljka. WT1 regulira proizvodnju neurotropnog

čimbenika nastalog iz gliadina (engl. Gliadin derived neurotropic factor (GDNF)) i čimebnika rasta hepatocita (engl. Hepocyte growth factor (HGF)) i BMP4 u mezenhimu. Stanice mokraćovodnog pupoljka stvaraju tirozin kinazne receptore RET za GDNF i MET za HGF i čimbenike rasta fibroblasta (engl. Fibroblast growth factor (FGF2) i koštani morfogenetski protein 7. Oba ova čimbenika rasta blokiraju apoptozu i stimuliraju proliferaciju u metanefrogenom mezenhimu i istovremeno održavaju stvaranje WT1. Pretvaranje mezenhimskih u epitelne stanice iz kojih nastaju nefroni posredovano je izražajem WNT9B i WNT6 koji potiču izraženost PAX2 i WNT4 u metanefrogenom mezenhimu. PAX2 potiče zgušnjavanje mezenhima prije stvaranje tubula dok WNT4 potiče epitelizaciju i stvaranje šupljih okruglih tvorbi bubrežnih mjehurića. One se izdužuju i nastaju metanefritički kanalići oblika slova S. Kapilarno klupko uraste u nišu jednog kraja tjelešca koje ima oblik slova S i diferencira se u glomerule. Proksimalni kraj svakog kanalića stvara Bowmanovu čahuru koja zajedno sa glomerulom čini bubrežno tjelešce. Distalni kraj metaferitičkog kanalića je sekretni kanalić koji se spaja s jednim od sabirnih kanalića. Daljnjim rastom i produžavanjem sekretnog kanalića nastaju proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja i distalni zavijeni kanalić [2,3].

Nefron i sabirna cjevčica u koju se on prazni čine osnovnu funkcionalnu jedinica bubrega. Svaki bubreg sadrži 1 do 4 milijuna nefrona. Nefron čine bubrežno tjelešce, proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja i distalni zavijeni kanalić. Henelova petlja ima oblik slova U i građena je od debelog dijela silaznog kraka, tankog dijela silaznog kraka, tankog dijela uzlaznog kraka i debelog dijela uzlaznog kraka. Mokraću nastalu u nefronima skupljaju sabirne cjevčice i cijevi i odvode je u bubrežne nakapnice. Jednoj sedmini nefrona glomeruli su smješteni na kortikomedularnoj granici i zovu se jukstamedularni nefroni, dok su ostalo kortikalni nefroni. Jukstamedularni nefroni imaju vrlo dugačke Henleove petlje, čiji su vrlo dugački tanki segmenti odgovorni za hipertonični okoliš u intersticiju srži.

Bubrežno tjelešce, proksimalni i distalni zavijeni kanalić smješteni su u kori bubrega dok je Henleova petlja smještena u srži. Bubrežno tjelešce građeno je od glomerula okruženog epitelnom čahurom dvostruke stijenke (Bowmanova čahura). U prostor između dviju stjenki Bowmanove čahure (mokraćni prostor) slijeva se glomerularni filtrat. Žilni pol je mjesto na kojem u bubrežno tjelešce ulazi dovodna arteriola, a izlazi odvodna arteriola, a nasuprot njega nalazi se mjesto spajanja mokraćnog prostor i lumena proksimalnog zavijenog kanalića, mokraćni pol.

Vanjska granica bubrežnog tjelešca je parijetalni list Bowmanove čahure građen od jednoslojnog pločastog epitela s bazalnom laminom i tankog sloja retikulinskih vlakana. Visceralni list Bowmanove čahure obavija kapilare glomerula i čine ga podociti. Podociti imaju stanični trup od kojeg polazi nekoliko primarnih izdanaka, s svaki od njih ima brojne sekundarne izdanke, nožice koje obuhvaćaju kapilare glomerula. Nožice jednog podocita obuhvaćaju više kapilara, a na jednoj kapilari nožice dvaju podocita ulaze jedne među druge. Prostori između nožica podocita su filtracijske pukotine široke oko 25 nm. Susjedne izdanke premošćuje 6 nm debela opna. Između fenestriranih kapilara glomerula i podocita nalazi se filtracijska barijera bazalna membrana, nastala stapanjem bazalnih lamina kapilare i podocita. U bazalnoj membrani se elektronskim mikroskopom razabiru periferna svijetla područja koja obiluju negativno nabijenim molekulama, dok je središnji gusti sloj bogat kolagenom tipa IV koji je fizički filter. Kroz bazalnu laminu ne prolaze čestice veće od 10 nm, niti proteini molekularne mase veće od albumina. U području žilnog pola nalaze se i mezangijske stanice koje su u kontinuitetu sa intraglomerularnim mezangijskim stanicama čiji citoplazmatski izdanci prodiru među endotelne stanice sve do lumena kapilara.

Na mokraćnom polu bubrežnog tjelešca jednoslojni pločasti epitel Bowmanove čahure prelazi u jednoslojni kubični ili cilindrični epitel proksimalnog zavijenog kanalića. Na luminalnoj stjenci epitelnih stanica proksimalnog zavijenog kanalića nalaze se brojni mikrovili koji čine četkastu prevlaku, dok bazalni dijelovi stanica imaju brojna uvrnuća membrane i lateralne interdigitacije. Stanice proksimalnog zavijenog kanalića nastavljaju se u stanice debelog silaznog kraka Henleove petlje, koje su im morfološki vrlo slične. Debeli krak se u svom silaznom dijelu naglo sužava i prelazi u jednoslojni pločasti epitel tankog dijela. Tanki dio silaznog i uzlaznog dijela Henleove petlje obložen je jednoslojnim pločastim epitelom čije se jezgre izbočuju u lumen kanalića. Debeli uzlazni krak obložen je jednoslojnim kubičnim epitelom, koji je sličan epitelu distalnih kanaliću. U kori se uz proksimalne kanaliće i bubrežna tjelešca nalaze i distalni zavijeni kanalići obloženi jednim slojem niskih kubičnih stanica s blijedom citoplazmom. Lumen kanalića je pravilan i jasno vidljiv. Macula densa je mjesto gdje distalni zavijeni kanalić dotiče žilni pol bubrežnog tjelešca, a kubične stanice prelaze u cilindrične s gusto zbijenim jezgrama zbog čega izgledaju tamnije. Sadržaj distalnog kanalića se dalje odvodi u sabirne cjevčice i cijevi. Prostor između mokraćnih kanalića, krvnih i limfnih žila kore i srži ispunjen je intersticijskim stanicama koje stvaraju međustaničnu tvar [4].

1.1.3. Fiziologija bubrega

Bubrezi imaju metaboličku, egzokrinu i endokrinu funkciju.

Metabolička i egzokrina funkcija

Osnovna funkcija bubrega je odstranjivanje otpadnih tvari unesenih u organizam ili proizvedenih metabolizmom. Zbog svoje osnovne funkcije bubrezi su jako dobro prokrvljeni te kroz oba bubrega protiče 21% srčanog minutnog volumena, što odgovara protoku od 1200 mL/min. Bubrezi su opskrbljeni arterijskom krvi putem bubrežnih arterija, koje se granaju u interlobarne, arkuatne, interlobularne arterije i potom u aferentne arteriole koje se nastavljaju u kapilare glomerula. U glomerulima filtracijom plazme nastaje glomerularni filtrat čiji je sastav gotovo jednak plazmi, izuzev bjelančevina koje se zbog jedinstvene građe glomerula ne filtraraju. Krv iz glomerula izlazi putem eferentnih arteriola i potom prolazi peritubularnim kapilarama koje se nastavljaju u žile venskog sustava, koje se spajaju i tvore interlobularne, potom arkuatne, interlobarne vene te bubrežnu venu. Glomerularna filtracija (GF) je volumen tekućine koji se filtrira iz glomerularnih kapilara u Bowmanovu čahuru u jedinici vremena. Veličinu GF određuje odnos između hidrostatskog i koloidno-osomotskog tlaka u glomerulu i hidrostatskog tlaka u Bowmanovoj čahuri. Glomerularni filtrat napušta Bowmanovu čahuru i zatim protječe kroz bubrežne tubule pri čemu mu se mijenja sastav. Glomerularni filtrat prelazi u proksimalne zavinute kanaliće gdje se reapsorbira više od polovice otfiltriranog natrija i vode. U proksimalnim kanalićima se prenosi 70-80% natrija aktivnim transportom, no uz natrij kotransportom se reapsorbiraju kloridi, bikarbonati i kalij te gotovo sva filtrirana glukoza i aminokiseline. U Henleovoj petlji se reapsorbira oko četvrtine filtriranog natrija, klorida i kalija. Mali dio originalnog filtrata dospijeva uzlaznim krakom Henleove petlje do distalnih zavinutih kanalića gdje se nastavlja reapsorpcija vode. Na početnom dijelu distalnog kanalića nalazi se macula densa koja sadrži kemoreceptore i dio je jukstaglomerularnog aparata, koji prilagođava tonus glomerularnih krvnih žila i kontrolira glomerularnu filtraciju mehanizmom povratne sprege. Ovim mehanizmom povećana koncentracija natrija u distalnom zavinutom kanaliću uzrokuje konstrikciju aferentne arteriole i smanjuje glomerularnu filtraciju, čime se smanjuje koncentracija natrija u distalnim zavinutima kanalićima, a povratnom spregom se ponovno

povećava glomerularna filtracija. U završnim distalnim kanalićima i kortikalnim sabirnim cijevima reapsorpcija natrija i vode je pod nadzorom hormona kore nadbubrežne žlijezde aldosterona. Nizak tlak ili hipovolemija potiču ativiranje sustava renin – angiotenzin - aldosteron čime se potiče reapsorpcija natrija, a time i povećanje volumena izvanstanične tekućine.

Filtrat koji napušta početni dio distalnih kanalića je hipoosmolaran, no prolaskom kroz završni dio distalnog kanalića i kortikalne sabirne cijevi velika količina vode se resorbira u kortikalni intersticij jer su ovi kanalići pod utjecajem visokih koncentracija antidiuretskog hormona vrlo propusni za vodu. Reapsorpcija vode se dalje nastavlja prolaskom tekućine kroz medularnu sabirnu cijev. Ovim mehanizam se stvara koncentrirana mokraća.

Još jedna važna funkcija bubrega je održavanje acido-bazne ravnoteže. U bubrezima se secerniraju vodikovi ioni, reapsorbiraju se i stvaraju bikarbonatni ioni. Sekrecija vodikovih iona i reapsorcija bikarbonatnih iona zbiva se u gotovo svim dijelovima kanalića. U umetnutim stanicama distalnih kanalića i sabirnih cijevi secernira se 5% vodikovih iona aktivnim prijenosom, ali taj mehanizam je ključan jer se koncentracija vodikovih iona u sabirnim cijavima može povećati gotovo 1000 puta [5,6]

Endokrina funkcija bubrega

U bubregu se izlučuje nekoliko hormona s važnim djelovanjem na različita tkiva i organe. U jukstagomerularnim stanicama aferentnih arteriola sintetizira se renin, koji nakon oslobađanja u krv potiče stvaranje angiotenzina I, čime se pokreće sustav renin-angiotenzin-aldosteron koja ima učinak na krvni tlak, homeostazu vode i natrija, i bubrežnu funkciju u cjelini.

Eritropoetin je jedini hormon sa učinkom na krvotvorne stanice koji se sintetizira izvan koštane srži. Proizvode ga bubreg i u manjoj mjeri jetra.

Vitamin D sudjeluje u metabolizmu kalcija povećanjem njegove apsorbciju iz probavnog sustava i djelovanjem na odlaganje kalcija u kosti i na apsorpciju kosti. U proksimalnim kanalićima bubrega se stvara 1,25- dihidroksikolekalcijferol, najaktivniji oblik vitamina D [5]

1.1.4. Zatajenje bubrežne funkcije

Reakcija bubrega na ozljedu

Oštećenje bubrega kojim se prepolovi početni broj nefrona zbog, primjerice, jednostrane nefrektomije, prisili preostale nefrone na prilagobu povećanjem njihove veličine i GF koja iznosi oko 80% normalne GF dva bubrega. U preostalom bubrežnom parenhimu povećava se svaka stanica, no vrlo mali broj stanica se umnaža. Mehanizam hipertrofije je samo donekle razjašnjen, a u signalnom putu sudjeluje lokalno stvoren angiotenzin II; TGF-β (engl. transforming growth factor beta); $p27^{kip1}$ protein staničnog ciklusa koji sprječava proliferaciju stanica tubula koje su izložene angiotenzinu II i epidermalni čimbenik rasta (engl. epidermal growth factor, EGF).
Postoji kritična masa nefrona, nakon čijeg gubitka ili oštećenja dolazi do nepovratnog oštećenja preostalih nefrona, što se klinički očituje kao napredovanje zatajenja bubrežne funkcije, a patohistološki se u ovih bubrega nalazi atrofija kanalića i fibroza intersticija. Put napredovanja bubrežnog zatajenja je zajednički bez obzira je li ozljeda nastala u glomerulu, tubulu ili intersticiju. U slučaju ozljede glomerula stvara se lokalizirana hipertenzija u kapilarnom klupku glomerula, što povećava GF svakog nefrona i potiče gubitak proteina u primarni urin. Značajna proteinurija praćena je lokalnim povećanjem stvaranja angiotenzina II i olakšava nizvodno nakupljanje citokina koji potiču nakupljanje monouklearnih leukocita u intersticiju. Neutrofilni leukociti koji su se prvi pojavili u intersticiju brzo se zamijenjeni nakupljenim makrofazima i limfocitima T. Neke stanice epitela kanalića procesom epitelno-mezenhimalnu tranzicije poprimaju karakteristike fibriblasta i doprinose intersticijskoj fibrozi. Fibroblasti svaraju kolageni matriks koji oštećuje susjedne kapilare i nefrone i stvara ožiljak građen od vezivnog tkiva [7]

1.1.5. Akutno zatajenje bubrežne funkcije

Akutno zatajenje bubrega (AZB) označava naglo smanjenje GF, nastalo kroz nekoliko sati ili dana [7]. Ono može nastati u sklopu različitih bolesti, dijagnosticira se u oko 5% bolesnika u bolnicama, a u približno 0.5% hospitaliziranih bolesnika potrebno je nadomjestiti bubrežnu funkciju [6]. Akutno zatajenje bubrega karakterizira nakupljanje spojeva dušika u organizmu i smanjenje diureze, koja se može kretati od anurije i oligurije (diureza < 400 mL), no može se izlučivati i više od 3L mokraće na dan. S obzirom na uzrok AZB, klinički sindromi objedinjeni

pojmom akutnog zatajenja bubrega mogu se podijaliti u 3 osnovne skupine: prerenalnu, intrinzičku i postrenalnu.

Prerenalno akutno zatajenje bubrega je najčešće (~ 55%). U prerenalnom AZB GF je smanjena zbog hemodinamskih promjena koje su uzrokovale smanjenje perfuzije bubrega. Stanice parenhima bubrega nisu oštećene, a ispravljanjem hemodinamskog poremećaja normalizira se bubrežna funkcija. Produžena hipoperfuzija može uzrokovati ishemiju stanica i uzrokovati intrinzično AZB. Svako stanje obilježeno hipovolemijom ili smanjivanjem efektivnog volumena cirkulirajuće krvi zbog sistemske vazodilatacije ili smanjenog udarnog volumena srca, može dovesti do razvoja prerenalnog AZB [6].

Intrinzičko AZB može nastati zbog ishemije ili toksičnog oštećenja tubula, bolesti tubula i intersticija, bolesti bubrežne mikrcirkulacije ili glomerula i bolesti većih krvnih žila bubrega. Akutno tubularno oštećenje je najčešći oblik intrinzinčnog oštećenja bubrega, a uzrokovana je ishemijom uslijed hipoperfuzije ili djelovanjem toksina.

Postrenalno AZB je uzrokovano opstrukcijom oticanja mokraće, u ovih bolesnika zatajenje bubrega nastaje u bolesnika s obostranom opstrukcijom, opstrukcijom ispod razine mokraćnog mjehura, ili u slučaju jednostrane opstrukcije jedinog funkcionirajućeg bubrega [6].

1.1.6. Kronično zatajenje bubrežne funkcije

Definicija

Kronično zatajenje funkcije bubrega (KZB) definira se oštećenjem bubrega ili glomerularnom filtracijom manjom od 60 mL/min/1.73 m^2, bez obzira na uzrok (tablica 1). Za svaku godinu nakon 30. godine života GF sa smanjuje u prosjeku za 1 ml/min na 1.73 m^2.

Tablica 1. *Kriteriji kroničnog zatajenja bubrega. [8].*

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

Prilagođeno prema: Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y i sur. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int 2005;67:2089-100. [8]

Težina bolesti bubrega klasificira se u pet stadija prema veličini GF što je prikazano u tablici 2. [8].

Tablica 2. *Klasifikacija kroničnog zatajenja bubrega.*

Stadij	GF mL/min na 1.73 m2
0	>90[a]
1	≤ 90[b]
2	60-89
3	30-59
4	15-29
5	<15

[a] uz čimbenike rizika za KZB; [b] uz dokazano oštećenje bubrežne funkcije (proteinurija, poremećaju sedimetna urina, biokemijskih pretraga krvi ili urina). Prilagođeno prema: Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y i sur. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int 2005;67:2089-100. [8]

Učestalost i pojavnost

Pojavnost različitih stadija KZB je usporediva u različitim dijelovima Europe što je pokazao De Jong i sur. analizom studija „Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease“ (PREVEND), „Estudio Epidemiologico de la Insuficiencia Renal en Espana“ (EPRICE) i North Trondelag Health Study (HUNT). Pojavnost stadija 1 i 2 je u rasponu od 5.3% do 7%. Stadij 3 ima 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% [9]. Ovi rezultati su usporedivi sa podacima dobivenim u Third National Health and Nutrition Examination survy (NHANES III) u Sjedinjenim Državama, 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 [10,11]. 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 [9]. U skladu sa svjetskim mjerilima u R. Hrvatskoj od kronične bolesti bubrega boluje (ili ima povećani rizik) oko 450 000 osoba. Prema podacima Hrvatskog registra nadomještanja bubrežne funkcije 2009.g. bilo je potrebno

nadomještanje bubrežne funkcije u 4 124 bolesnika što odgovara pojavnosti od 930 bolesnika/milijun stanovnika [12].

Čimbenici rizika

Čimbenici rizika koji povećavaju podložnost bubrežnom oštećenju su starija dob, KZB drugih članova obitelji, prirođeno ili stečeno smanjenje mase bubrega. Šećerna bolest, arterijska hipertenzija, pretilost i metabolički sindrom direktno uzrokuju oštećenje bubrega. Bolesti bubrega s izrazitom proteinurijom pogoršavaju bubrežno oštećenje i ubrzavaju smanjenje funkcije bubrega [13]. U tablici 3 navedeni su čimbenici rizika koji pogoduju ili direktno uzrokuju oštećenje bubrežne funkcije.

Tablica 3. *Klasifikacija čimbenika rizika kroničnog zatajenja bubrežne funkcije i njenog ishoda [8].*

Čimbenik rizika	Mogući mehanizam	Uočene poveznice
Nastanak KZB	Povećavaju podložnost oštećenju funkcije bubrega	Starija dob, kronična bolest bubrega u obiteljskoj anamnezi, prirođena ili stečena manja bubrežna masa, stanja primarne hiperfiltracije, srčano-žilne bolesti, slabiji socio-ekonomski status
	Direktno uzrokuju oštećenje bubrežne funkcije	Šećerna bolest, hipertenzija, pretilost, metabolički sindrom, dislipidemija, hiperkalcemija, autoimune bolesti, sustavne infekcije, infekcije mokraćnog sustava, bubrežni kamenci, opstrukcija mokraćnog sustava, toksičnost lijekova
Pogoršanje KZB	Pogoršava oštećenje i ubrzava smanjenje bubrežne funkcije	Tip bolesti bubrega, teži oblici proteinurije
Komplikacije KZB	Povećani rizik komplikacija smanjene GF	Ne-KZB čimbenici povezani sa hipertenzijom, anemijom, pothranjenošću, poremećajima kosti i minerala
	Ubrzavaju početak ili pogoršanje srčano-žilnih bolesti	Uobičajeni čimbenici rizika za srčano-žilne bolesti, ne-tradicionalni čimbenici rizika vezani uz KZB
	Povećavaju pobol i smrtnost u zatajenju bubrega	Niska doza dijalize (Kt/V), opterećenje tekućinom, privremeni žilni pristup, teška anemija, niska razina albumina u serumu, kasno otkrivanje bolesti

Prilagođeno prema: Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y i sur. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int 2005;67:2089-100. [8].

Patogeneza

Kronično zatajenje funkcije bubrega može biti posljedica dva mehanizama oštećenja. Ono može biti posljedica djelovanja zaštitnih mehanizama specifičnih za osnovu bolest, primjerom djelovanja imunih kompleksa i posrednika upale u određenim tipovima glomerulonefritisa ili izloženosti toksinima u intersticijskim bubrežnim bolestima. U bubrezima s dugotrajno smanjenom bubrežnom masom, kronično zatajenje nastaje zbog hiperfiltracije i hipertrofije preostalih nefrona. Odgovori na smanjen broj nefrona posredovani su vazoaktivnim hormonima, citokinima i čimbenicima rasta. U konačnici ova kratkotrajna prilagodba hipertrofijom i hiperfiltracijom postane nedostatna jer povećani tlak i protok pogoduju sklerozi i razaranju preostalih nefrona. Povećana aktivnost sustava renin-angiotenzin-aldosteron pridonosi i početnoj prilagodnoj hiperfiltraciji i posljedičnoj neprilagođenoj hipertrofiji i sklerozi, prvenstveno putem TGF- β1.

Kronično zatajenje bubrega je uglavnom asimptomatično u 1. i 2. stadiju, no bolest koja je dovela do zatajenja bubrega može biti simptomatska, npr. mogu se javiti edemi u nefrotskom sindromu, hipertenzija kao posljedica bolesti bubrežnog parenhima. U tim stadijima bubrežno oštećenje se otkriva albuminurijom u urinu, tj. nalazom albumina > 30 mg/dU. Daljnjim smanjenjem GF prema stadiju 3 ili 4 javljaju se i klinički znakovi i patološki laboratorijski nalazi. U ovim stadijima zahvaćeni su gotovo svi organi, a najočitiji simptomi su smanjen apetit, slabost, umor, nemogućnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti i nalaz normocitne anemije. Također postoji i poremećaj homeostaze kalcija, fosfora, vitamina D3 i paratiroidneog hormona, te poremećaji elektrolitne i acido-bazne ravnoteže. 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.

Bolesnci u završnom stadiju KZB razvijaju uremijski sindrom koji je posljedica gubitka ekskretorne, metaboličke i endokrine funkcije bubrega. Uremijskim sindromom pogođeni su gotovo svi organski sustavi. Gubitak ekskretorne funkcije rezultira nakupljanjem organskih spojeva, kao što su karbamid, kratinin, gvanidin, metil-gvanidin, mokraćna kiselina, cAMP, poliamini, pri čemu su ureja i kreatinin dobri pokazatelji bubrežne funkcije no toksično djelovanje imaju spojevi koji su topivi u vodi, vezani za proteine, električno nabijeni, spojevi

guanidina, poliamini, mioinozitoll, indoli i molekule srednje veličine. Ovi spojevi utječu na agregaciju tormbocita, povećavaju koncentracije lijekova u krvi i pridonose anemiji [14].
U većine bolesnika sa stabilnim KZB ukupni sadržaj vode i natrija je blago povećan, iako to nije klinički uočljivo. Smanjena glomerularna filtracija natrija, praćena je smanjenom reapsorpcijom, zbog čega se natrij zadržava u organizmu, a što prati zadržavanje vode i uzrokuje povećanje volumena izvanstanične tekućine.

Hiperkalemija 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, ARB) i diuretici koji štede kalij (spironolakton) i stanja kao što je hiporeninemički hipoaldosteronizam, šećerna bolest, bolesti koje prvenstveno pogađaju distalni dio nefrona (opstruktivna uropatija i nefropatija srpastih stanica) [7].

Acidoza nastaje pri smanjenju GF < 20 ml/min, daljnji gubitak nefrona uzrokuje nedovoljnu sintezu amonijaka, smanjenu regeneraciju bikarbonata u tubulima i smanjenu sposobnost izlučivanja protona vodika. Istodobno zadržavanje aniona (fosfat, sulfat i anioni organskih kiselina) uzrokuju acidozu s anionskim procjepom. Nedovoljno izlučivanje vodikovih iona smanjuje koncentraciju bikarbonata u plazmi [7].

Poremećaj metabolizma kalcija i fosfata očituju se bolestima kosti i kalcifikacijama krvnih žila. Poremećaji koštanog metabolizma mogu se klasificirati u dvije skupine: 1.Velikog koštanog obrtaja (npr. osteitis fibroza cistika) 2. Niskog koštanog obrtaja (npr. adinamična bolest kosti i osteomalacija). Poremećaji u odnosima fosfata, kalcija, vitamina D i PTH koji nastaju u bolesnika sa KZB stvaraju složeni poremećaj koji neki autori zovu „savršenom olujom“. U središtu poremećaja je sekundarni hiperparatireoidizam (SHPT). U uznapredovanom zatajenju funkcije bubrega, smanjenje GF uzrokuje nakupljanje fosfata koji stimulira sekreciju PTH direktno i indirektno uzrokujući i recipročno snižavanje razine kalcija u krvi. SHPT-u doprinose smanjenje aktivnosti kalcitriola (zbog smanjene aktivnosti 1-alfa hidroksilaze u bubrezima, hiperfosfatemije i malih rezervi vitamina D i fosfaturičnog čimbenika rasta fibroblasta-23 (FGF-23)), pojačana razgradnja aktivnog hormona i smanjen izražaja receptora za vitamin D [15]. Prema jednoj studiji biopsija kosti gotovo tri četvrtine bolesnika sa KZB stadijem 3 i 4 imalo je

histološke znakove bolesti kosti, većinom uzrokovanog nereguliranim hiperparatiroidizmom koji su uključivali osteitis fibroza cistika i miješanu osteodistrofiju [16].

Poremećaji s niskom koštanom pregradnjom uključuju adinamičnu bolest kosti i osteomalaciju, što su nekada 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. Za adinamičnu kost je karakterisitčno smanjenom ili odsutno stvaranje kosti i smanjen broj osteoblasta i osteoklasta [17].

Normocitna, normokromna, neregenerativna anemija posljedica je smanjenog stvaranja eritropoetina zbog gubitka bubrežnog parenhima, 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, infekcije [7,14].

1.2. NADOMJEŠTANJE FUNKCIJE BUBREGA

1.2.1. Hemodijaliza

Temeljna pretpostavka nadomještanja bubrežne funkcije hemodijalizom temelji se na procesu difuzije pri kojem dvije otopine različite koncentracije otopljenih tvari, odjeljenje polupropusnom membranom, teže izjednačavanju koncentracija otopljenih tvari . Na učinkovitost difuzije utječe koncentracijski gradijent i veličina molekula u odnosu na veličinu pora, brzina kretanja molekula (brzina protoka krvi i dijalizata), građa membrane dijalizatora (debljina, površina i broj pora), kao i odlaganje bjelančevina na površinu membrane [6]. Molekule vode prolaze kroz sve vrste polupropusnih membrana. Ultrafiltracija je proces pri kojem se promjenom hidrostatskog tlaka u krvnom prostoru odnosno prostoru s dijalizatom može mijenjati količina vode koju se oduzima iz krvi bolesnika [6]. Veličina ultrafiltracije ovisi o transmembranskom tlaku - razlici tlaka s obje strane membrane, kao i o koeficijentu ultrafiltracije membrane dijalizatora. Koeficijent ultrafiltracije (KUf) definira se kao količina tekućine izražena u mililitrima koja u satu prođe kroz membranu po mm Hg razlike u tlakovima s obje strane membrane. Proces ultrafiltracije, a naročito prilikom filitriranja velikih količina tekućine kroz vrlo propustljive membrane s relativno velikim porama, može pospješiti odstranjivanje malih do srednje velikih molekula iz krvi bolesnika na dijalizi – procesom konvekcije [6].

1.2.2. Peritonealna dijaliza

Difuzija je također temeljni proces u nadomještanju bubrežne funkcije peritonealnom dijalizom, a peritonealna membrana služi kao polupropusna membrana za izmjenu tvari. Pri ovoj metodi utače se dijalizna otopina koja sadrži elektrolite i glukozu ili ikodekstrin u peritonealnu šupljinu putem peritonealnog katetera. Uremički toksini prelaze iz krvi u dijalizat niz koncentracijski gradijent, a osomolatnost dijalizata određuje prelazak vode. Dijalizat se istače iz trbušne šupljine, te se postupak ponavlja svakih 6 sati. Za započinjanje metode potrebno je postaviti peritonealni kateter, čiji vrh je smješten u maloj zdjelici, a vanjski dio ostaje izvan trbušne šupljine.

1.2.3. Transplantacija bubrega

Transplantacija bubrega je metoda izbora u liječenju završnog stadija kroničnog zatajenja bubrega. Rizik od smrti bolesnika s bubrežnim presatkom je upola manji od rizika bolesnika na dijalizi [18]. Transplantacijom bubrega se često postiže uredna egzokrina i endokrina funkcija bubrega [19]. Gotovo sve bolesnike s kroničnim zatajenjem bubrežne funkcije treba razmotriti kao moguće primatelje presatka bubrega. Apsolutne kontraindikacija za transplantaciju bubrega su rijetke. To su: zloćudna bolest, te aktivna sustavna infekcija i/ili bilo koja bolest s očekivanim trajanjem života kraćim od 2 godine [20]. No ipak od svih bolesnika liječenih dijalizom za transplantaciju je podobno 25-30% [19]. Presađivanje bubrega je oblik liječenja koji ovim bolesnicima omogućava kvalitetu života najbližu onoj koju su imali sa funkcionalnim bubregom. Prema podacima registra „European Renal Association“ preživljenje bolesnika godinu dana nakon transplantacije bubrega preminulog davatelja iznosi 90.1% , dok je 5 godišnje preživljenje bilo 77.7% [21].

Jedan od važnih preduvjeta za uspješno liječenje presađivanjem bubrega je prethodno adekvatno liječenje metodama dijalize, osim u slučaju preemptivne transplantacije koja predstavlja najbolju opciju liječenja.

Bubreg se može presaditi sa živog srodnog ili nesrodnog darivatelja ili mrtvog darivatelja (kadavera). Prema našem zakonu darivatelj bubrega može biti živa punoljetna srodna ili nesrodna osoba ili kadaver. U Hrvatskoj je u 2011. godini 92,3% darovanih bubrega bilo od preminulog darivatelja dok je 7.7% bilo od živog srodnog ili nesrodnog darivatelja [22]. Graničnim darivateljima smatraju se oni stariji od 60 godina te oni u dobi od 50 do 60 godina s barem dva od tri uvjeta: serumski kreatinin prilikom smrti veći od 133 μmol/L, cerebrovaskularni incident kao uzrok smrti i darivatelji koji su bolovali od arterijske hipertenzije. U slučaju graničnih darivatelja, često je potrebno učiniti biopsiju potencijalnog presatka prije transplantacije čime se može procijeniti stupanj glomerulosleroze, intersticijske fibroze i atrofije tubula te promjene na krvnim žilama, na temelju koje se odlučuje od prikladnosti organa za presađivanje.

Ljudski imunološki sustav razlikuje sebe od stranoga pomoću površinskih staničnih proteina koji se zovu ljudski leukocitni antigeni (engl. Human leukocyte antigenes, HLA), a proizvod su šest blisko povezanih antigena na kratkom kraku 6. kromosoma, poznatih kao glavni sustav histokompatibilnosti (engl. Main histocompatibility compex, MHC). Prilikom

presađivanja stanica ili organa, aktiviraju se imuno-kompetentne stanice i mobiliziraju stanične i tkivne obrambene mehanizme. Tuđi ljudski leukocitni antigeni su glavni cilj imunološkog odgovora koji dovodi do odbacivanja presađenog organa [16]. U svrhu što slabijeg imunološkog odgovora na presadak potrebna je što veća podudarnost u HLA antigenima između primatelja i darivatelja bubrega. Geni I klase histokompaibilnosti su HLA-A, B i C, smješteni su na 6. paru kromosoma, a nalaze se na svim stanicama s jezgrom i trombocitima. Geni II. klase glavnog sustava histokompatibilnosti su HLA-DR, DP i DQ, a njihovi produkti su izraženi su na limfocitima B, monocitima-makrofazima i dendritičkim stanicama. T limfocti i epitelne stanice bubrežnih kanalića izražavaju proteine II. razreda samo ako su aktivirani citokinima. Testiranjem histokompatibilnosti nastoji se pronaći kombinacija davatelja i primatelja bubrega koja ima najveću vjerojatnost uspješne transplatacije, temeljem: određivanja AB0 krvne grupe, HLA podudarnosti i testa križne reakcije sa davateljem. Križna reakcija testira humoralnu senzitizacija primatelja na davatelja. U transplantaciji se obično određuju tri leukocitna antigena HLA-A, B i DR, koji u paru određuju najviše šest podudarnosti između davatelja i primatelja organa. Pri određivanju HLA podudarnosti imunološki je važnija podudarnosti antigena DR, za razliku od I. klase. Veliki dio centara kao minimum zahtjeva navodi dvije podudarnosti; jedan B uz jednu DR podudarnost [16].

Uzroci gubitka presatka mogu se podijeliti na rane, tj. nastale u prvih 6 mjeseca nakon transplantacije, kasne nakon 6 mjeseci i vrlo kasne uzroke 5 godina nakon transplantacije [23]. Rani uzroci gubitka presadak uključuju hiperakutno i akutno odbacivanje presatka, promjene na velikim krvnim žilama presatka kao što se stenoza arterije bubrega ili tromboza arterije ili vene bubrega, te nefunkcionalni presadak i zloćudne novotvorine [23]. Kasni uzroci gubitka presatka, koji nastaju nakon 6 mjeseci od transplantacije, su smrt sa funkcionalnim presatkom i kronična disfunkcija presatka koji su podjednako česti. Prema nekim autorima kasni gubitak presatka se smatra gubitkom presatka nakon 12 mjeseci od transplantacije i u ovih bolesnika uzroci gubitka presatka su smrt s funkcionalnim presatkom i kronična disfunkcija presatka [24]. Uzroci ranog i kasnog gubitka funkcije presatka navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. *Uzroci ranog i kasnog gubitka presatka*

< 6 mjeseci od transplantacije	> 6 mjeseci od transplantacije
Hiperakutno odbacivanje Akutno odbacivanje Promjene na velikim krvnim žilama bubrega Nefunkcionalni presadak Zloćudne novotvorine	Smrt sa funkcionalnim presatkom Kronična disfunkcija presatka

Prilagođeno prema: Prommool S, Jhangri GS, Cockfield SM, Halloran PF. Time dependency of factors affecting renal allograft survival. J Am Soc Nephrol 2000;11:565-73. [22]

Rani gubitak presatka - tromboza presatka

Tromboza uzrokuje gubitak 2-7% bubrežnih presadaka u ranom razdoblju. Najčešće nastaje u prvih 48 sati nakon transplantacije, no tromb se može stvoriti i nakon prvog posttransplantacijskog tjedna [25,26]. Trombozirati mogu bubrežna arterija i vena. Tromboza je uzrokovana ozljedama pri operativnom zahvatu „žilnom štipaljkom“ ili „perfusion cannulation“, a češća je u presadaka s višestrukim bubrežnim arterijama (tromboza se događa u 36% presadaka sa višestrukim bubrežnim arterijama), a jedini nezavisni čimbenik rizika nastanka tromboze presatka je postojanje aterosklerotskog plaka u bubrežnoj arteriji [27]. Trombozu bubrežne arterije može potaknuti primjena monoklonskog protutijela na CD3 koje ima prokoagulantnu aktivnost [28, 29]. Rizik je veći u bolesnika liječenih visokim dozama metilprednizolona [25].

Tromboza bubrežne vene može nastati zbog presavijanja vene, suženja venske anastomoze, propagacije duboke venske tromboze donjih ekstremiteta ili pritiska tekućine oko presatka. Hiperkoaguabilno stanje nakon operacije ili nasljedni poremećaj zgrušavanja mogu također potaknuti trombozu.

Povećan rizik tromboze imaju i bolesnici s antifosfolipidnim sindromom [30]. Inhibitori kalcijneurina mogu uzrokovati hipofibrinolizu povećanjem izražaja plazminogena aktivator inhibitora [31]. Hipofibrinoliza se nalazi i u bolesnika liječenih dugotrajnom hemodijalizom ili

peritonealnom dijalizom [32]. Prema nekim autorima tromboza presatka je češća u bolesnika liječenih peritonealnom dijalizom [33, 34]. No drugi nisu našli razliku u učestalosti tromboze u bolesnika liječenih hemodijalizom ili peritonealnom dijalizom [35-37]. Značajni čimbenici rizika su i ranije tromboze vena, dijabetička nefropatija i hemodinamska nestabilnost nakon operacije [36] odgođena funkcija presatka i akutno odbacivanje [34,37]

Kasna tromboza presatka nastala 14 dana nakon transplantacije je najčešće posljedica traume, no zabilježeni su slučajevi tromboze nakon angiografije, angioplastike ili ugradnje stenta [38].

Tromboza presatka uglavnom uzrokuje ireverzibilni gubitak presatka koji je se potom mora kirurški ukloniti.

Rani gubitak presatka - stenoza bubrežne arterije

Stenoza bubrežne arterije se javlja u 3% - 12.5% transplantiranih bolesnika [39]. Najčešće nastaje u prvih 2-22 postransplantacijska dana [40]. Uzrok stenoze bubrežne arterije je višestruk i uključuje ozljedu „kirurškom štipaljkom“, disekciju tunike intime bubrežne arterije, pogreške pri šivanju anastomoze i presavijanje dugačke bubrežne arterije. Predisponirajući čimbenici su produženo vrijeme hladne ishemije, toksičnost ciklosporina, akutno stanično odbacivanje i infekcija citomegalo virusom [41, 42, 43]. Liječenje je operativnim zahvatom ili perkutanom transluminalnom angioplasikom.

Rani gubitak presatka - hiperakutno odbacivanje

Hiperakutno odbacivanje nastaje neposredno nakon transplantacije. Reakcija odbacivanja je posredovana protutijelima primatelja na antigene endotelnih stanica glomerula i mikrovaskulature presatka. Vezanje protutijela aktivira kaskadu komponenata komplementa, što uzrokuje nekrozu endotelnih stanica, agregaciju trombocita i lokalno stvaranje ugrušaka. Liječi se isključivo kirurškim uklanjanjem presatka, no zbog niza imunoloških testiranja koja prethode transplantaciji, vrlo je rijetko [40].

Rani gubitak presatka - akutno odbacivanje posredovano protutijelima

Tri do pet dana nakon transplantacije može nastupiti akcelerirano odbacivanje presatka [40]. Ono je posredovano slabo specifičnim protutijelima koja stvaraju ranije senzibilizirani B limfociti. Protutijela su usmjerena na MHC antigene endotela peritubularnih ili glomerularnih kapilara. Oštećen endotel kapilara oslobađa molekule kao što su von Willebrandov faktor, P-selektin koji potiču agregaciju trombocita; citokine i kemokine kao što su IL- 1α, IL-8 kemokin ligand 2, koji uzrokuju adheziju leukocita na glomerule ili dilatirane peritubularne kapilare; i C3a i C5a. U peritubularnim kapilarama se često nalazi C4d marker klasične aktivacije komplementa. C5b aktivira stvaranje kompleksa C5b-C9 koji uzrokuju lokaliziranu nekrozu i apoptozu endotela, kao i odvajanje stanica endotela od bazalne membrane [44]. Liječenje uključuje uklanjanje protutijela plazmaferezom ili imunoadsorbcijom, bolusima kortikosteroida, intravenoznu primjenu imunoglobulina ili antiproliferativnih lijekova [40].

Rani gubitak presatka - akutno odbacivanje posredovano T limfocitima

Akutno odbacivanje presatka posredovano T limfocitima je klinički najčešća reakcija odbacivanja koja nastaje u roku od 7 do 90 dana od transplantacije. Rizični čimbenici za akutno odbacivanje su broj HLA podudarnosti, mlađa dob primatelja, starija dob darivatelja, senzibilizacija (PRA >0%), odgođena funkcija presatka [18].

Broj ataka akutnog odbacivanja se usavršavanjem imunosupresivne terapije smanjuje, a jedan od posljednjih koraka u tom smjeru bilo je uvođenja indukcijske imunosupresivine terapije. U patofiziologiji reakcije akutnog odbacivanja presatka bubrega sudjeluju dendritičke stanice darivatelja koje prezentiraju antigene darivatelja u drenirajući limfni čvor ili slezenu, gdje aktiviraju T limfocite primatelja. T limfociti se potom diferenciraju u različite podskupine, vraćaju u presadak i sudjeluju u njegovom razaranju [44]. Najčešći histopatološki nalaz akutnog staničnog odbacivanja je tubulitis, s infiltracijom limfocita ispod bazalne membrane i oštećenjem stanica kanalića. Osim tubulitisa postoji i vaskularni oblik akutnog odbacivanja kojeg karakterizira infiltracija krvnih žila monouklearnim stanicama, apoptoza endotelnih stanica i umnažanje međustaničnog matriksa tunike intime. Žilno odbacivanje ne odgovara na liječenje kortikosteroidima i zahtijeva liječenje anti-limfocitnim protutijelima [44]. Klinički akutno

odbacivanje presatka se očituje pogoršanjem bubrežne funkcije, porastom vrijednosti kreatitinina i ureje u serumu, a sigurni znakovi akutnog odbacivanja su febrilitet, otok i bolnost presatka. Prilikom svake sumnje na akutno odbacivanje preporučuje se učiniti biopsiju presatka.

Klasifikacija iz Banff-a

Svi uzorci biopsija transplantiranih bubrega patohistološki se analiziraju i gradiraju prema klasifikaciji iz Banff-a. Prva klasifikacija iz Banff-a nastala je 1993.g iz potrebe standardiziranja patohistoloških nalaza biopsija presađenih bubrega te određivanja težine i vrste odbacivanja, što je ključno prilikom donošenja odluke o nastavku liječenja bolesnika [45]. Od tada do danas ova klasifikacija se redovito revidira i nadopunjuje, a klasifikacija iz 1997.g je osnova današnje klasifikacije i orijentacijski dokument patologije transplantiranih bubrega. Posljednja revizija klasifikacije je objavljena 2007.g. Klasifikacijom iz Banffa se semikvantitativno boduje zahvaćenost kanalića upalom (tubulitis), upala stjenke arterija (arteritis) i upala intersticija. Tubulitis (t) se boduje prema broju mononuklearnih stanica u kanaliću, a gradiran je od t0- izostanak mononukleara u kanalićima do t3- fokusi sa više od 10 stanica po poprečnom presijeku kanalića. Arteritis (v) se boduje prema stupnju upale arterijske stijenke (intimalnog arteritisa). Upalni infiltrat intersticija nije sam za sebe kriterij odbacivanja, no za postavljanje dijagnoze je potrebna prisutnost upale intersticija, stoga što je minimalna, a ponegdje i značajna upala intersticija prisutna u biopsijama asimptomatskih bolesnika. Za procjenu intersticijske upale (i), minimalno 10% korteksa mora biti zahvaćeno upalom (i1), a teškom upalom intersticija smatra se zahvaćenost više od 50% korteksa. Boduje se i upala glomerula iako ona nije jedan od kriterija odbacivanja u ovoj klasifikaciji [46]. Za procjenu akutnog ili kroničnog odbacivanja posredovanog protutijelima potreban je nalaz pozitivnog imuno bojanja na C4d i/ili imunoglobulini u peritubularnim kapilarama. Upala u peritubularnim kapilaram boduje se prema broju upalnih stanica u kortikalnim peritubularnim kapilarama. Stupnjevanje upale je rangirano od peritubularnog kapilaritisa (ptc) 0- manje od 10% peritubularnih kapilara zahvaćeno upalom do ptc 3 više od 10% peritubularnih kapilara ima kapilaritis sa više od 10 upalnih stanica u lumenu [47].

Nakon bodovanja patološki nalazi biopsija mogu se svrstati u dijagnostičke kategorije: 1) normalan nalaz; 2) promjene posredovane protutijelima; 3) granične promjene; 4) stanično

odbacivanje posredovano T limfocitima; 5) intersticijska fibroza i tubularna atrofija i 6) druge promjene. Detaljan prikaz svih kategorija nalazi se u tablici 5.

Tablica 5. *Banff 97 dijagnostičke kategorije za biopsiju bubrežog presatka - Banff 07 nadopuna*

1. **Normalno**
2. **Promjene posredovane protutijelima** (mogu se poklapati sa kategorijama 3, 4 i 5 i 6)
Pristustvo cirkulirajućih protutijela primatelja na darivatelja i C4d ili patologija alografta za odbacivanje (presatka)
C4d depoziti bez morfoloških znakova aktivnog odbacivanja
C4d+, prisutna cirkulirajuća protutijela primatelja na darivatelja, bez znakova akutnog ili kroničnog TCMR ili ABMR (t.j. g0, cg0, ptc0, bez lameliranja peritubularnih kapilara).
Akutno odbacivanje posredovano protutijelima
C4d+, prisutna cirkulirajuća protutijela primatelja na darivatelja, morfološki znakovi akutnog oštećenja tkiva, kao što su: (Tip/Stupanj):
I. ATN u slična minimalna upala
II. Kapilaritis i/ili glomerulitis (ptc/g >0) i/ili tromboza
III. Nekroza stijenke arterija —v3
Kronično aktivno odbacivanje posredovano protutijelima
C4d+, prisutnost cirkulirajućih protutijela primatelja na darivatelja, morfološki znakovi kroničnog oštećenja tkiva, kao što su duplikature membrana glomerula i/ili lameliranje bazalne membrane peritubularnih kapilara i/ili intersticijska fibroza/tubularna atrofija i/ili fibrozno zadebljanje arterija
3. **Granične promjene:** 'Sumnja'na akutno odbacivanje posredovano T limfocitima (mogu se poklapati sa kategorijama 2 i 5 i 6)
Ova kategorija se upotrebljava kada ne postoji intimalni arteritis, ali fokalno postoji tubulitis (t1, t2 ili t3) sa minimalnom infiltracijom intersticija (i0 ili i1) ili infiltracija intersticija (i2, i3) sa blagim (t1) tubulitisom
4. **Akutno odbacivanje posredovano T limfoctima** (može se poklapati sa kategorijama 2 i 5 i 6)

Akutno odbacivanje posredovano T limfocitima (Tip/Stupanj:)
IA. Značajna infiltracije intersticija (>25% zahvaćenog parenhima, i2 ili i3) i fokalno umjereni tubulitis (t2)
IB. Značajna infiltracija intersticija (>25% zahvaćenog parenhima, i2 ili i3) i fokalno teški tubulitis (t3)
IIA. Blagi do umjereni intimalni arteritis (v1)
IIB. Teški intimalni arteritis koji zahvaća >25% lumena (v2)
III. Transmuralni arteritis i/ili fibrinoidne promjene arterija i nekroza glatkih mišićnih stanica medije sa pretećom limfocitnom upalom (v3)
Kronično aktivno odbacivanje posredovano T limfocitima
'kronična arteriopatija presatka' (fibroza intime arterija sa infiltracijom mononukleara u fibrozu, stvaranje neo - intime)
5. **Intersticijska fubroza i tubularna atrofija,** bez znakova specifične etiologije
(može uključivati nespecifičnu žilnu ili glomerularnu sklerozu, ali težina je stupnjevana prema promjenama tubulointersticija)
Stupanj
I. Blaga intersticijska fibroza i tubularna atrofija (<25% koreteksa)
II. Umjerena intersticijska fibroza i tubularna atrofija (26–50% korteksa)
III. Teška intersticijska fibroza i tubularna atrofija (>50% korteksa)
6. **Drugo:** Promjene za koje se ne smatra da su posljedica odbacivanja—akutnog i/ili kroničnog; mogu uključivati izolirane g, cg ili cv ozljede i poklapati se sa kategorijama 2, 3, 4 i 5)

Kratice: *TCMR, akutno odbacivanje posredovano T limfocitima (engl. T-cell-mediated rejection); ABMR, odbacivanje posredovano porutijelima (engl. Antibody mediated rejection); g, glomerulitis; ptc peritubularni kapilaritis; ATN akutna tubularna nekroza; v, arteritis; t, tubulitis; i, intersticijska upala*

Prilagođeno prema: Solez K, Colvin RB, Racusen LC i sur. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. Am J Transplant 2008;8:753-60. [47]*;*

Infekcije nakon transplantacije bubrega

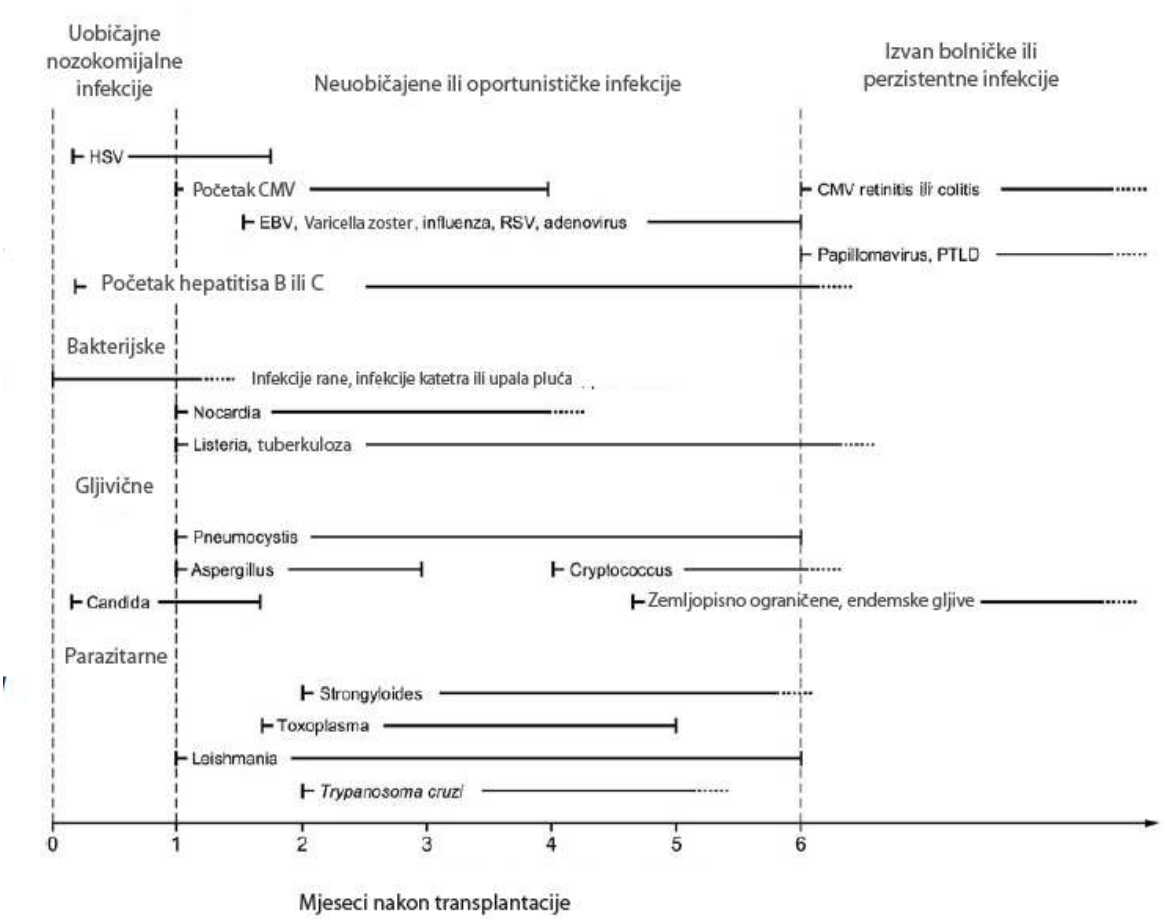
Infektivne komplikacije nakon transplantacije bubrega značajno povećavaju pobol i smrtnost ovog postupka [48]. Analizom „UNOS“ baze podataka prikazano je infekcije čine 7.7% uzroka gubitka presatka [49]. Infekcije su na drugom mjestu uzroka smrti bolesnika sa funkcionalnim presatkom [50].Primjenom novih imunosupresivnih protokola smanjen je broj epizoda akutnog odbacivanja presatka ali je povećan rizik infektivnih komplikacija. Gotovo 80% bolesnika u prvoj godini nakon transplantacije ima komplikaciju u vidu infekcije [51]. Prema radu Sireli Regina de Sousa i sur. pregledom povijesti bolesti 1676 bolesnika u razdoblju od 6 godina u 2 brazilska centra za transplantaciju 49% bolesnika je imalo infektivnu komplikaciju u prvoj godini nakon transplantacije bubrega. U prvom posttransplantacijskm mjesecu 31,3 % bolesnika je imalo infektivnu komplikaciju, 24% u drugom mjesecu i 32% u trećem mjesecu nakon transplantacije. Smrtnost ovih bolesnika je iznosila 7.9% [52].

Zbog evidentne ozbiljnosti infektivnih komplikacija provode se preventivne mjerenje probira darivatelja i primatelja presatka bubrega. U našem transplantacijskom centru prema protokolu Eurotransplanta potencijalnim primateljima i darivateljima bubrega u pretransplantacijskoj obradi radi se probir na protutijela za citomegalo virus (CMV), Ebstein-Barr virus (EBV), virus humane imunodeficijencije (HIV), hepatitis B virus, hepatitis C virus, Varicella-Zoster virus (VZV), Herpes simpex 1 i 2 virus (HSV), na toxoplasmu gondii i treponemu palidum.

Rizik od infektivne komplikacije se osobito povećava prilikom liječenja ataka akutog odbacivanja bolusima kortikosteroida ili prilikom primjene antilimfocitne terapije kao što je timoglobulin [53]. Nakon ove terapije se povećava rizik od CMV, BKV ili EBV infekcije, ali i od bakterijskih, gljivičnih i parazitarnih infekcija [53].

Robert Rubin je prije 2 desetljeća napravio shemu pojavnost infekcija prema vremenskom periodu koji je protekao od transplantacije, ova shema je i danas aktualna uz neke modifikacije (slika 1). Kao što je uočljivo na shemi u prvom mjesecu nakon transplantacije većinu infektivnih komplikacija čine komplikacije kirurškog zahvata. Drugi period od 2 do 6 mjeseci nakon transplantacije, obično je vezan uz transplantaciju i imunosupresivno liječenje, a u trećem periodu nakon 6 mjeseci od transplantacije postoje 3 rizične skupine bolesnika [53]. U prvoj skupini su bolesnici sa dobro funkcionalnim presatkom, kojima su reducirane doze

imunosupresiva i imaju malen rizik oportunističkih infekcija. Drugu skupinu čine bolesnici sa značajnim odbacivanjem i/ili intenzivnom imunosupresijom i disfunkcijom presatka, ova skupina bolesnika je podložna oportunističkim infekcijama u drugom periodu. Treća skupina su bolesnici u kojih dolazi do kasne reaktivacije virusa, kao što su BK virus, kasni CMV, HBV ili HCV i humani papiloma virus [54]. U našem transplantacijskom centru, svakom bolesniku sa presađenim bubregom koji je febrilan i kod kojeg se sumnja na infekciju pristupa se širokoj dijagnostičkoj obradi, koja se u slučaju sumnje na zahvaćanje pluća vrlo često nadopunjuje MSCT-om toraksa, te hitnom bronhoskopijom s uzimanjem bronhoalveolarnog lavata za mikrobiološku analizu. U liječenju se primjenjuju antibiotici širokog spektra te prema kliničkoj procjeni antivirusni ili antifungalni lijekovi. U slučaju da ne dolazi do poboljšanja, smanjuje se imunosupresivna terapija, na prvom mjestu ukida se mikofenolat mofetil te ostaju niže doze kalcijneurinskih inhibitora i kortikosteroida. U slučaju da u bolesnika sa životno ugoržavajućom infekcijom koji ima smanjenu imunosupresiju dođe do pogoršanja bubrežne funkcije ili razvije druge simptome i znakove akutnog odbacivanja presatka u bolesnika se indicira hitno kirurško uklanjanje presatka.



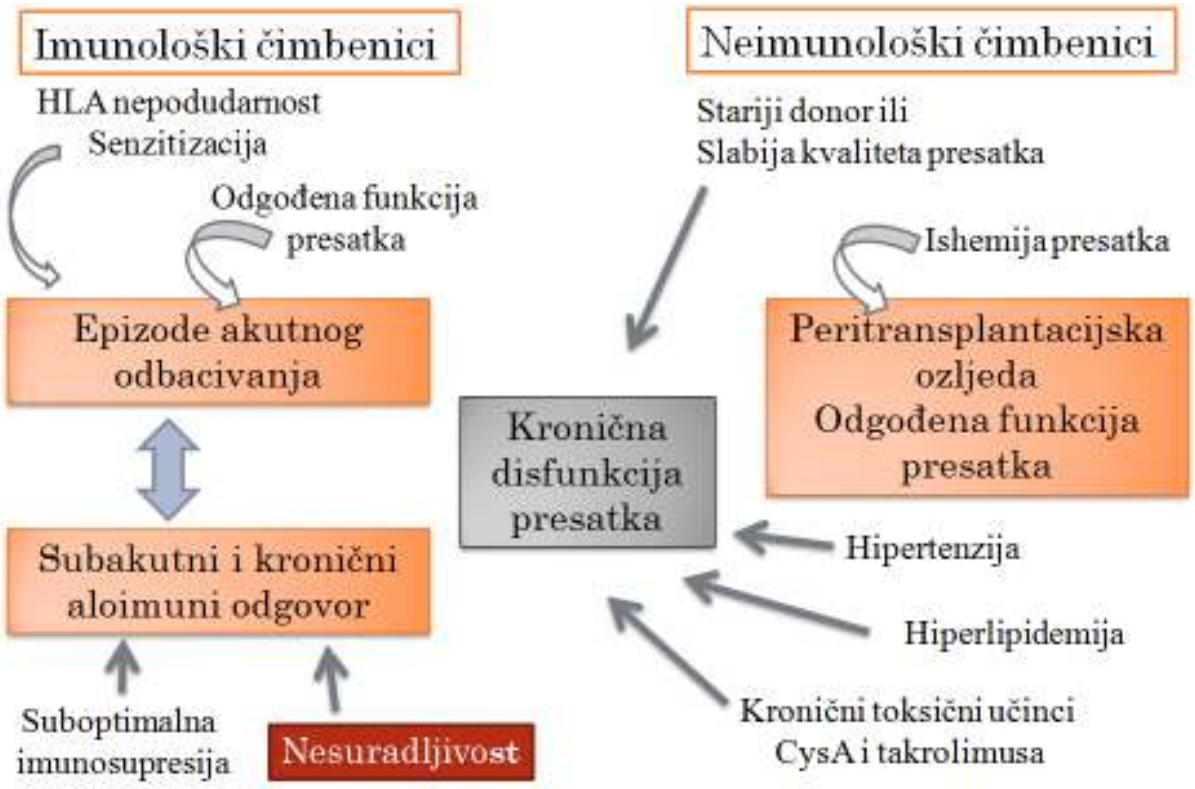
Slika 1. *Shema uobičajene pojave infekcija nakon transplantacije bubrega. Pune linije označavaju najčešći vremenski period pojave infekcije, iscrtkane linije označavaju period postojećeg, ali manjeg rizika. Kratice CMV, citomegalovirus; EBV, Ebstein-Barr virus; HSV, Herpes simplex virus; PTLD- posttransplantacijska limfoproliferativna bolest; RSV, respiratorni sincicijski virus.*Prilagođeno prema: Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. N Engl J Med. 1998; 338(24):1741-1751 [53].

Kasni gubitak presatka

Gubitak presatka godinu dana nakon transplantacije smatra se kasnim gubitkom presatka. Oko 50% ovih presadaka se izgubi zbog smrti bolesnika s funkcionalnim presatkom, a 50% izgubljenih presadaka uzrokovano je njihovom kroničnom disfunkcijom. Nakon prve godine od transplantacije kronična disfunkcija presatka uzrokuje gubitak 3 do 5 % presadaka godišnje [55]. Klinički se očituje postepenim gubitkom bubrežne funkcije koji se prati mjesecima i godinama nakon transplantacije. Postupno u bolesnika dolazi do porasta kreatinina u serumu, arterijske hipertenzije i pojave proteinurije. Patohistološki nalaz biopsije u ovih bolesnika ukazuje na različiti stupanj intersticijske fibroze, tubularne atrofije, vrlo često i arteriolopatije [56, 57, 58].
Kronična disfunkcija presatka je posljedica djelovanja više imunoloških i neimunoloških čimbenika. U imunloške procese su uključeni antigen specifični T stanični odgovor i imunološki odgovor posredovan protutijelima [55].

Od neimunoloških čimbenika vrlo je značajna peritransplantacijka ozljeda i odgođena funkcija presatka, a osobito je štetna odgođena funkcija presatka u kombinaciji s atakama akutnog odbacivanja [55]. Dob darivatelja, kvaliteta presatka i broj nefrona u presatku su važni predskazatelji njegovog dugoročnog preživljenja [57, 58, 59]. Da li je presadak od živog ili kadaveričnog davatelja također utječe na njegovu dugoročnu funkciju. Preživljenje presadaka živih nesrodnih darivatelja slabije HLA podudarnosti je dugoročno odgovaralo preživljenju presadaka haploidentičnih, živućih, srodnih darivatelja ili HLA identičnih kadaveričnih darivatelja [60, 61]. Inhibitori kalcijneurina (ciklosporin i takrolimus) su temelj imunosupresivnog liječenja ovih bolesnika, no oni imaju i nefrotoksičan učinak koji doprinosi kroničnoj disfunkciji presatka [62-65].

Sam bolesnik kojem je transplantiran bubreg doprinosi preživljenju presatka svojom suradljivošću i redovitim uzimanjem imunosupresiva i druge propisane terapije, čime su determinirani i učinci poremećaja lipida, šećerne bolesti i arterijske hipertenzije za koje je također pokazano da doprinose napredovanju kronične disfunkcije presatka [66, 67].
Svi čimbenici koji djeluju na razvoj i napredovanje konačne disfunkcije presatka prikazani su na slici 2.



Slika 2. Rano oštećenje presatka uzorkovano peritransplantacijski ozljedama i epizodama akutnog odbacivanja rezultiraju gubitkom funkcionalnih nefrona, čime imunološki i neimunološki čimbenici doprinose razvoju kronične disfunkcije presatka. CyA-ciklosporin A. *Prilagođeno prema:Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. N Engl J Med 2002 21;346:580-90 [55].*

Bez obzira na osnovni uzrok, rezultat ozljede je upala, koja se u bubrežnom presatku nikada ne riješi u potpunosti, a alogena razlika donora i primatelja doprinose stalnoj infiltraciji presatka T i B limfocitima i makrofazima, koju prate proliferativni odgovori posredovani kemokinima, citokinima i čimbenicima rasta [68].

U postupni gubitak funkcije presatka uključeni su svi dijelovi bubrežnog parenhima; krvne žile, glomeruli, intersticij i tubuli, no glavni čimbenik je tubulointersticijska fibroza [69]. Epitelne stanice tubula čine više od 75% stanica bubrežnog parenhima te njihova podložnost ozljedi određuje dugoročno preživljenje presatka [70]. Ozljeda epitelnih stanica tubula se povezuje s pojavom fibroblasta koji imaju karakteristike nalik na miocite u intersticiju bubrega. Iako ove stanice mogu biti porijekla fibroblasta intersticija ili cikulirajućih stanica meznhima, vrlo je vjerojatno da epitelne stanice kanalića pri odgovoru na ozljedu prolaze kroz fenotipsku

promjenu epitelno mezenhimalne tranzicije. Pokazano je da je proces epitelno mezenhimalne tranzicije (EMT) jedan od glavnih puteva koji vode do gubitka nefrona i razvoja fibroze [71]. U ovom procesu stanice epitela tubula gube svoj fenotip karakterističan za epitel i poprimaju karakteristike stanica mezenhima [72-74]. TGFβ1 je član TGFβ superobitelji [75] i ima višestruke učinke. TGFβ1 je glavni induktor stvaranja izvanstaničnog matriksa također sudjeluje u regulaciji staničnog rasta, diferencijacije, stvaranja citokina i moduliranja stanične imunosti [76-78].

TGF β1 je ključni fibrogeni čimbenik koji regulira EMT u stanicama epitela tubula [79, 80]. Čini se da je održavanje normalne bubrežne funkcije ovisno o ravnoteži signalizacije anti-fibrogenim putem koji aktiviraju koštani morfogenetski proteini i pro-fibrogenog puta aktiviranog TGFβ1-om [81]. O anti-fibrogenom učinku postoje višestruki dokazi. U eksperimentalnim modelima bolesti sa izraženom fibrozom bubrega izražaj koštanog morfogenetskog proteina 7 je značajno smanjen. Primjerom, izražaj mRNA BMP 7 je potisnut nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede, jednostrane opstrukcije uretera, pijelonefritisa, kronične nefropatije alografta i u genetskim murinim modelima Alportovog sindroma i lupus nefritisa [82-87]. No u uzorcima tkiva transplantiranih bubrega postoji samo jedno istraživanje aktivacije unutarstanične signalizacije potaknute koštanim morfogenetskim proteinom 7.

U uzorcima biopsija transplantiranih bubrega u vrijeme akutnog odbacivanja pokazano je maleno smanjenje unutarstanične signalizacije potaknute BMP- 7, dok je ono značajno smanjeno u uzorcima kroničnog odbacivanja sa jasnom tubulointersticijskom fibrozom [81].

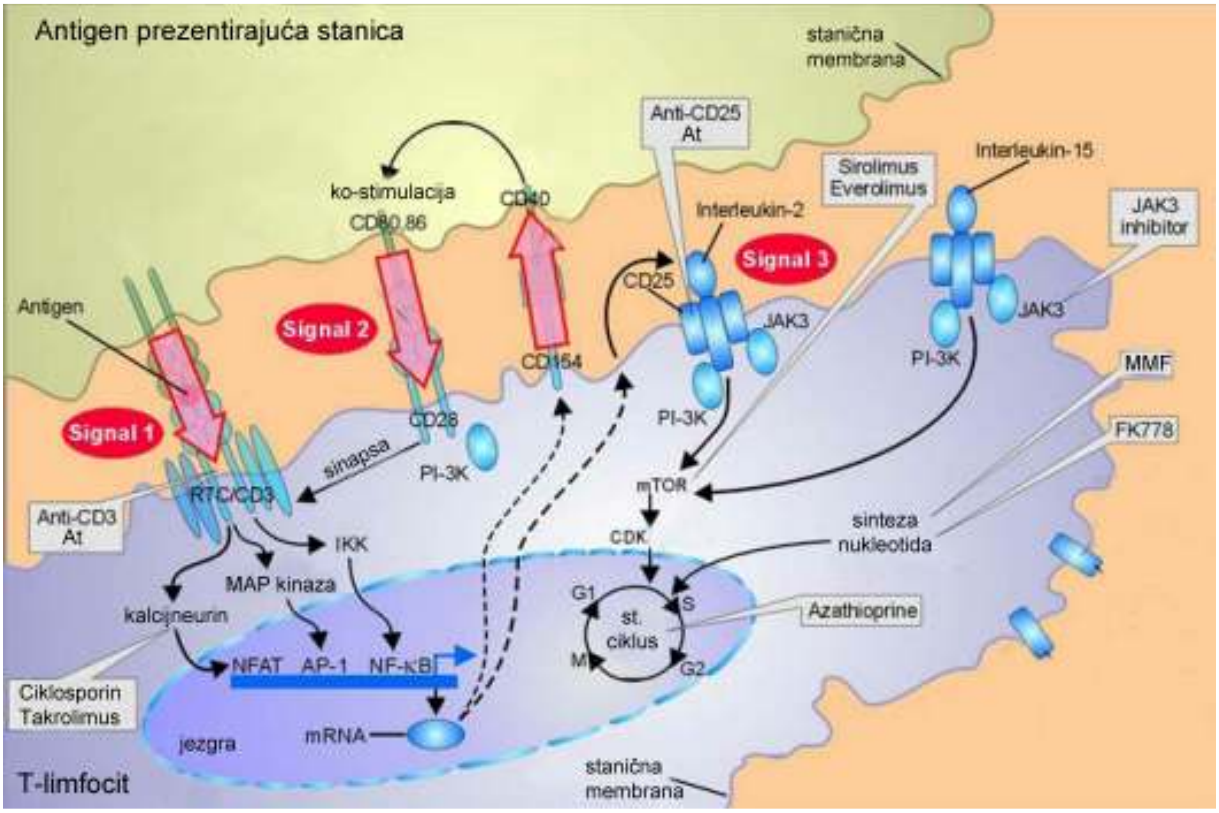
Imunosupresivno liječenje

U kliničkoj praksi našeg transplantacijskog centra, od 2011.g. a prema KDIGO preporukama iz 2009.g. u imunosupresivnom liječenju bolesnika sa transplantiranim bubregom koristi se terapija indukcije i održavanja u svih bolesnika. Naime Cai i Terasaski su uočili da je primjena indukcijske terapije povećala preživljenje bolesnika i presadaka [88]. Do tada su svi bolesnici liječeni trojnom terapijom održavanja, a odluka o primjeni indukcijske terapije ovisila je o broju HLA nepodudarnosti, prethodnoj senzibilizaciji i kliničkoj procjeni transplantacijskog tima.

Imunosupresivne lijekove se može podijeliti s obzirom na mehanizam njihovog djelovanja tj. s obzirom na njihovo mjesto djelovanja u staničnom ciklusu. Kortikosteroidi imaju mnogostruke učinke, za transplantaciju su najvažniji njihovi generalizirani protuupalni učinci i onemogućavanje antigen prezentirajuće stanice u prikazu aloantigena T limfocitima [89, 90] (slika 3). U slučaju kontakta aloantigena i specifičnog T staničnog receptora, za daljnji unutarstanični prijenos poruke o aktivaciju stanica iz G0 u G1 fazu staničnog ciklusa je nužan CD3 membranski kompleks. Na ovaj kompleks se vežu anti CD3 protutijela i sprečavaju daljnju aktivaciju T limfocita. Nakon aktivacije T staničnog receptora unutar stanice se aktivira kaskada posrednicima fosfatidilinozitola, koji povećavaju unutrastanično koncentraciju kalcija, što istovremeno aktivira protein kinazu C i kalmodulin, koji aktivira kalcijneurin, što dalje rezultira aktivacijom transkripcije limfokina među kojima je i interleukin 2 (IL2) [40]. Ciklosporin ili takrolimus se vežu na kalcijneurin i time ga inhibiraju čime prekidaju dalju aktivaciju T limfocita smanjivanjem stvaranja proupalnih limfokina [40].

U G1 fazi anti CD25 protutijela blokiraju vezanje interleukina-2 (IL-2) na α-lanac heterotrimernog receptora, a sirolimus blokira provođenje signalne kaskade nakon prihvata signala [40].

Azatioprin i mikofenolat mofetil su relativno neselektivni antiproliferativni lijekovi koji djeluju na umnažanje gotovo svih stanica. Oni prekidaju sintezu nukleotida nužnih za proliferaciju stanica [92]. Mjesto djelovanja pojedinih imunosupresiva prikazano je na slici 3.



Slika 3. *Prikaz mjesta djelovanja imunosupresiva u staničnom ciklusu. AntiCD3At- protutijelo na CD3;antiCD25At protutijelo na CD25, MMF- mikofenolat mofetil.* Prilagođeno prema: Halloran PF.Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. N Engl J Med 2004; 351:2715-2729*[91]*.

Anti CD25 protutijela se koriste u terapiji indukcije. Pokazano je da je primjena anti CD25 protutijela u indukcijskoj terapiji smanjila broja akutnih odbacivanja u prvoj godini od transplantacije [93]. U kliničkoj primjeni je baziliksimab, a do kraja 2011.g bio je u upotrebi i daclizumab. Bazilikisimab je kimerično mišje i humano protutijelo te se daje u 2 doze na dan transplantacije i 4 posttransplantacijski dan, a daclizumab je humano monoklonsko protutijelu koje se daje u 3 doze na dan transplantacije, 7. i 14. posttransplantacijski dan. Nije uočena razlika u ishodu transplantacije u bolesnika liječenih baziliksimabom u usporedbi sa daclizumabom [94]. Protutijela na CD3 su se ranije koristila u terapiji indukcije, dok se danas daju u liječenju akutnog staničnog odbacivanja otpornog na kortikosteroide. Bolesnici sa većim imunološkim rizikom (primjerom senzibilizirani bolesnici) u terapiji indukcije mogu biti liječeni zečjim antitimocitnim globulinom, koji se neselektivno vežu na T limfocite i uzrokuju njihovu depleciju. U ovih bolesnika je pokazana manja učestalost akutnih odbacivanja i akutnih odbacivanja neosjetljivih na kortikosteroide u usporedbi sa anti CD25 protutijelima [95]

Terapiju održavanja čine inhibitori kalcijneurina, antiproliferativni lijekovi i kortikosteroidi. Ciklosporin i takrolimus inhibiraju kalcijneurin i sprječavaju transkripciju mRNA proupalnih citokina [40], no osim protuupalnog djelovanja imaju i profibrogeni učinak potičući stvaranje TGFβ u različitim vrstama stanica, o čemu će biti više riječi nešto kasnije u tekstu. U prvih 6 mjeseci od transplantacije održavaju se više koncentracije ciklosporina i takrolimusa u plazmi, koncentracija ciklosporina održava se u rasponu vrijednosti 150 do 250 ng/mL, a takrolimsa 7-12 ng/mL, a nakon 6 mjeseci njihove doze se smanjuju. U bolesnika kod kojih postoji pogoršanje bubrežne funkcije te su biopsijom potvrđeni znakovi toksičnosti kalcijneurinskih inhibitora, ciklosporin ili takrolimus se zamjenjuju sirolimusom.

U antiproliferativne lijekove spadaju mikofenolat mofetil i azatioprin. Azatioprin je bio temeljni antiproliferativnih lijek ranijih imunosupresivnih protokola. Azatioprin je analog merkaptopurina i inhibira sintezu DNK i RNK, čime neselektivno sprječava proliferaciju stanica [40]. Danas je mikofenoat mofetil (MMF) antiproliferativni lijek izbora, on djeluje slično azatioprinu no ima manje toksične učinke na probavni sustav i minimalno suprimira koštanu srž. Prema istraživanjima provedenim u transplantacijskom centru u Austriji primjena MMF-a kao antiproliferativnog lijeka u usporedbi sa azatioprinom pokazala je dugoročno manji gubitak presadaka u odnosu na protokole koji su koristili azatioprin [96]. Analizom baze podataka „Collaborative study database“ uočena je značajno manja učestalost odbacivanja presadaka u bolesnika liječenih MMF-om u odnosu na bolesnike liječene azatioprinom [97]. Većina transplantiranih bolesnika u našem centru u svom imunosupresivnom protokolu prima mikofenolat mofetil.

Svi bolesnici s transplantiranim bubregom u našem centru primaju kortikosteroide čije su doze također više u prvih 6 mjeseci od transplantacije, a nakon 6 mjeseci od transplanatcije se počinju smanjivati. Kortikosterodi se koriste i u liječenju ataka akutnog staničnog odbacivanja. Tada se primijenjuju tzv. bolusi kortikosteroida, što označava infuziju 500-1000 mg 6 metil-prednizolona dnevno kroz 3 dana, a liječenje se može se produžiti i na 5 dana ovisno o kliničkom odgovoru bolesnika.

Kirurško uklanjanje presatka

Kirurški postupak kojim se uklanja transplantirani bubreg zove se graftektomija bubrega. Podijeljeno je mišljenje o indiciranosti ovog postupka. U kliničkoj praksi presadak se uklanja u slučaju hiperakutnog odbacivanja, tromboze velikih krvnih žila i drugih tehničkih komplikacija pri operativnom zahvatu [98]. Pojedini autori su stava da asimptomatski nefunkcionalni presadak nije potrebno uklanjati zbog povećanog rizika pobola i smrtnosti operativnog zahvata uklanjanja presatka [99, 101]. Prednosti ostavljanja presatka su sinteza eritropoetina, hidroksilacija kalcidiola, održavanje rezidualne diureze i manji rizik senzitizacije. Nakon kirurškog uklanjanja presatka u 8.3% do čak 97% bolesnika utvrđena su protutijela na HLA antigena (PRA) [98]. Protutijela se pojavljuju u relativno nesenzibiliziranih bolesnika, prije graftektomije, neovisno o uzroku zatajenja presatka i dosežu najviše razine nekoliko mjeseci nakon zahvata [98]. U vrlo senzibiliziranih bolesnika nakon kirurškog uklanjanja presatka značajno se smanjuje postotak PRA [102]. No nefunkcionalni presadak može biti izvor sepse [103] ili kronične upale koja može uzrokovati komplikacije kao što je rezistencija na eritropoetin [104]. Ayus i suradnici su pokazali 32% manji relativni rizik od smrti svih uzroka u bolesnika nakon graftektomije. Studija je učinjena na velikom reprezentativnom uzorku bolesnika na dijalizi nakon zatajenja funkcije presatka [105].

1.3. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI

Koštani morfogenetski proteini pripadaju nadobitelji TGF-beta. Obuhvaćaju veliku skupinu filogenetski konzerviranih činitelja rasta. Do danas je poznato više od 20 članova obitelji [106].

Isprva otkriveni u koštanom tkivu šezdesetih godina prošlog stoljeća, BMP su uskoro otkriveni i u ostalim tkivima i organima. Dr. Marshall Urist je početkom šezdesetih godina prošlog stoljeća istraživao sposobnost stvaranja ektopičnog koštanog tkiva. Dokazao je da organska komponenta kostiju ima sposobnost stvaranja kosti na izvanskeletnim mjestima. Proteine organskog matriksa kosti je nazvao „koštanim morfogenetskim proteinima“ [107-109]. Korištenjem tehnika molekularne biologije otkriveni su različiti proteini s osteoinduktivnom ulogom koji pripadaju nadobitelji TGF- β [110].

Nadobitelj TGF-β se sastoji od nekoliko obitelji signalnih molekula: TGF-beta, BMP, aktivini, inhibini i GDNF [111]. Svi su po građi dimerne molekule sa sličnim primarnim slijedom aminokiselina. Svaka podjedinica sadrži tri disulfidne veze unutar lanaca, a podjedinice su međusobno vezane četvrtom vezom. Većinom nastaju kao velike prekursorne molekule koje cijepanjem propeptida poprimaju definitivan aktivan oblik [112].

Na temelju sličnosti strukture i funkcije BMP se dijele u četiri podgrupe: BMP-1/4, BMP5/6/7/8a/8b, BMP9/10 i BMP12/13/14. Svaki BMP ima specifična strukturna obilježja koja ga diferenciraju od ostalih članova obitelji [112].

1.3.1. Sinteza koštanih morfogenetskih proteina

Koštani morfogenetski proteini se sintetiziraju kao veliki prekursori veličine 400 do 500 aminokiselina koje se sastoje od N-terminalnog signalnog peptida, prodomene koja određuje konformaciju i C-terminalnog zrelog peptida [113]. Nakon dimerizacije djelovanjem serinskih endoproteaza dolazi do odcjepljivanja C-terminalnog slijeda na Arg-X-X-Arg odsječku. Aktivni BMP se sastoje od 50-100 aminokiselina sa sedam cisteina, od kojih šest formiraju intramolekularne disulfidne veze poznate kao cisteinski čvorovi. Sedmi cistein služi za dimerizaciju s drugim monomerom stvarajući kovalentnu disulfidnu vezu, i time biološki aktivnu

signalnu molekulu [114]. Samo BMP-3, GDF-9 i BMP-15 koji nemaju sedmi cistein, funkcioniraju kao monomeri. Svi ostali BMP stvaraju homodimere ili heterodimere. Heterodimerizacija BMP-2/5, BMP2/6, BMP2/7 i BMP4/7 je uočena u in vivo i in vitro uvjetima, i čini se da su takvi heterodimeri znatno učinkovitiji aktivatori signalnih puteva od njihovih homodimera. Dimerizacija dovodi do stvaranja konveksne i konkavne strane proteina što je ključno za ostvarivanje njihove funkcije, ali im daje i stabilnost [114].

Koštani morgofenetski proteini imaju gene koji ih kodiraju. Izbacivanjem pojedinih gena za različite članove BMP obitelji došlo se do važnih spoznaja o njihovoj ulozi u razvoju organa i organskih sustava [115] (tablica 6).

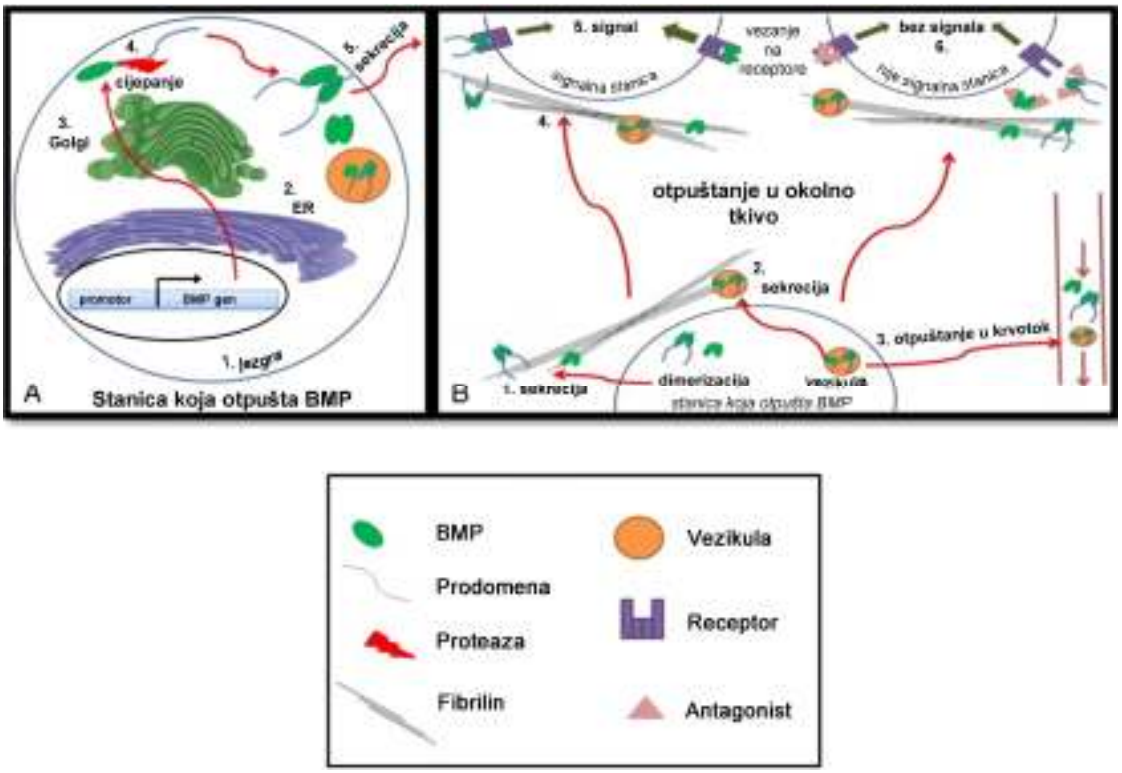
Tablica 6. *Uloga BMP-a u razvoju organa i organskih sustava [115].*

BMP	Bolest
BMP-2	Maleni alantois, nedostatak amniona, srčane anomalije
BMP-3	Povećana gustoća kosti
BMP-4	Anomalije srca, ciste na bubrezima, kraniofacijalne malformacije, defekti prstiju
BMP-5	Kratke uši, defekti skeleta, pluća i bubrega
BMP-6	Hidrocefalus, odgođena osifikacija sternuma
BMP-7	Poremećen razvoj bubrega i oka, defekti skeleta
BMP-8	Poremećaji u spermatogenezi i razvoju epididimisa
BMP-14	Brahipodizam
BMP-15	Poremećen razvoj leđne moždine
GDF-1	Asimetrija tijela
GDF-8	Uvećana mišićna masa
GDF-9	Neplodnost, poremećeno stvaranje folikula
GDF-11	Poremećen razvoj aksijalnog skeleta

Prilagođeno prema: Zhao GQ. Consequeences of knocking out BMP signaling in the mouse. Genesis 2003; 35:43-56.

1.3.2. Izvanstanična regulacija

Nakon cijepanja na primarnom mjestu, prodomena ostaje povezana sa zrelim aktivnim BMP dimerom putem kovalentne veze. Danas se zna da zadržavanje prodomene ima ulogu u direktnom vezanju na fibriline izvanstaničnog matriksa. Pojedini pripadnici obitelji podliježu sekundarnom cijepanju unutar prodomene čime nastaje kratka ili duga prodomena što utječe na daljnji prijenos signala. BMP-4 i BMP-2 imaju takva sekundarna mjesta cijepanja unutar prodomena [114]. Ostaje čitav niz nepoznanica u tom području i tek nam preostaje objasniti procese i značenje homo i heterodimerizacije članova obitelji s različitim oblicima prodomene. Pojašnjenje tih mehanizama bi moglo pojasniti i problem biološke raspoloživosti BMP. Situaciju dodatno komplicira činjenica da BMP 1-7 mogu postojati i kao sastojci vezikula matriksa unutar hondrocita ploče rasta [116]. Te vezikule služe kao mineralizacijski centri s različitim potencijalom djelovanja ovisno o položaju unutar ploče rasta. Zna se da su BMP-2 i BMP-4 prisutni u serumu i općenito se smatra da se radi o aktivnim zrelim oblicima, što ne mora uvijek biti slučaj. Biološka raspoloživost aktivnih oblika BMP je dodatno kompliciranа postojanjem različitih inhibitora. Danas je poznato više od 15 različitih antagonista [117]. Smatra se da strukturalna osnova za njihovu inhibitornu aktivnost leži u odsutnosti sedmog cisteinskog ostatka koji je neophodan za dimerizaciju. Mehanizam kojim djeluju inhibitorno na BMP još nije poznat. Vjeruje se da mogu blokirati međudjelovanje BMP s receptorom bilo maskiranjem epitopa na BMP koji su odgovorni za interakciju s receptorima tip I i II ili da se natječu za isto vezno mjesto. Djelovanje antagonista ovisi o njihovom izražaju, biološkoj raspoloživosti i afinitetu prema određenom članu BMP obitelji. Veza između BMP i antagonista nije kovalentna i zbog toga može biti reverzibilna [118].



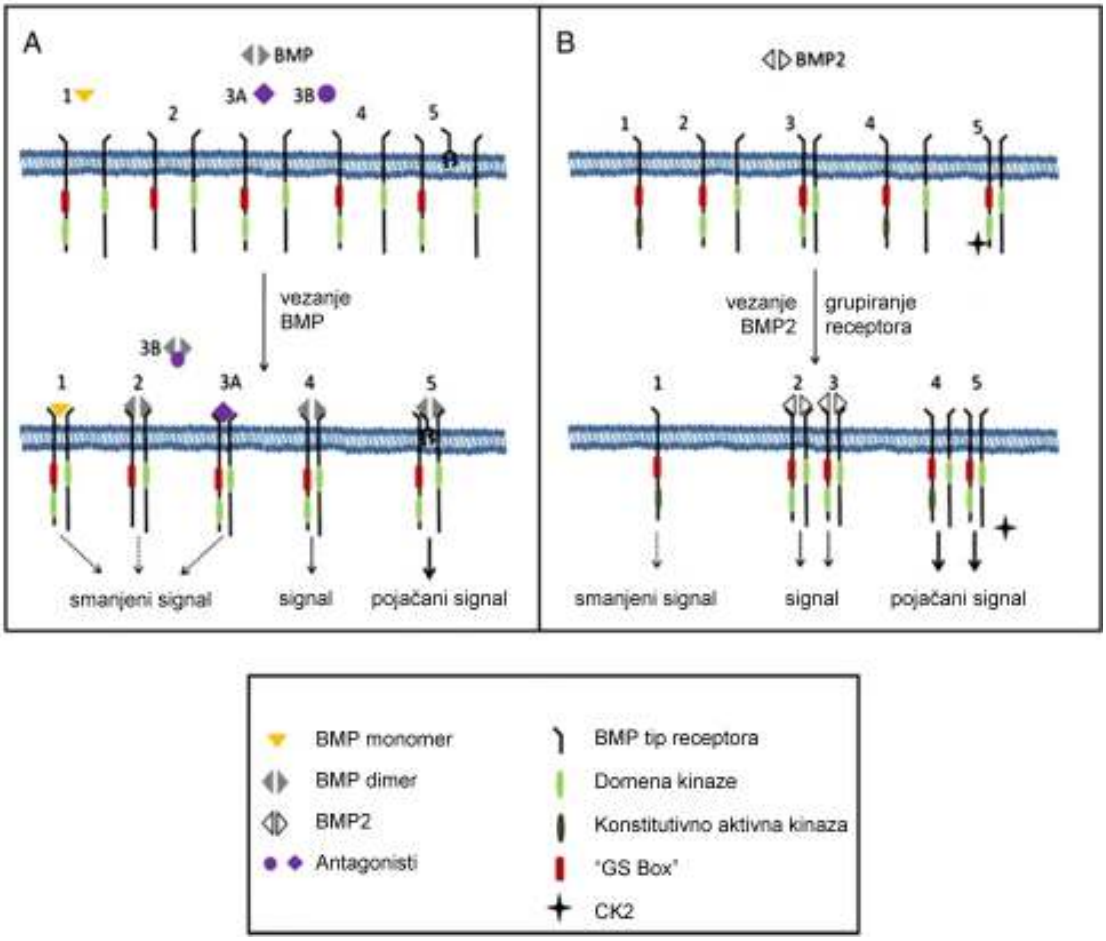
Slika 4. *Regulacija na izvanstaničnoj razini. A proces sekrecije BMP: 1. Transkricija BMPa u jezgri. 2. Translacija u ER, 3.Posttranslacijske promjene u Golgievom aparatu, 4.Proteolitičko cijepanje prodomena i dimerizacija monomera, 5. Sekrecija iz stanice u vidu dimera bez prodomene ili u vezikulama. B sudbina BMPa nakon sekrecije: 1. Sekrecija dimera BMPa sa prodomenom ili bez nje i međudjelovanje sa izvastaničnim matriksom. 2.BMP može biti izlučen i u vezikuli u matriks, 3. Sekrecija BMPa u krvotok, 4.Izlučeni BMP je u međudjelovanju sa susjednim stanicama, 5. Dimeri BMP-a se vežu na receptore i započinju signali put, 6.djelovanje antagonista BMPa izravnim vezanjem na BMP ili na receptor. ER –endoplazmatski retikulum.*
Prilagođeno prema: Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell Signal. 2011;23:609-20. [118].

1.3.3. Regulacija na staničnoj površini

Na površini stanice dolazi do spajanja BMP liganda s izvanstaničnom domenom BMP receptora čime se stvara signalni sklop [118].

Receptori za BMP su serin/treonin kinazni receptori, građeni od kratke izvanstanične domene s 10 do 12 cisteinskih ostataka, pojedinačne transmembranske domene, i unutarstanične serin/treonin kinazne domene [111]. Postoji pet poznatih BMP receptora tip I: ALK 1, ALK 2, ALK 3 (BRIa), ALK 4 i ALK 6, i tri receptora tip II: BR II, ActRIIa i ACTRIIb. Neki od njih služe kao receptori i ostalim članovima nadobitelji TGF-β [119]. Svi receptori dijele osnovnu strukturu, ali različite vezne površine i relativna lokacija proizvode različite modele vezanja za BMP i ostale članove obitelji. Koji od receptora tip I će stupiti u interakciju s pojedinim BMP je određeno strukturnim obilježjima i ostacima koji su izloženi na veznim površinama i liganda i receptora. U pojedinačnim slučajevima je proces moduliran posttranslacijskim promjenama kao što je N-glikozilacija BMP-6 koja je neophodna za interakciju s ActR-I. Koštani morfogenetski proteini se vežu na specifične receptore različitim intenzitetom. Pri niskim efektivnim koncentracijama BMP će se vezati na dimerni tip I receptora za koji imaju viši relativni afinitet prije vezanja na monomerni tip I receptora. Izvješća o afinitetu BMP-7 za vezanje na receptore su neujednačena. Pojedini autori navode da BMP-7 ima viši afinitet vezanja na receptor tipa II, dok drugi smatraju da je afinitet podjednak za vezanje na receptore tip I i II. Sliku dalje komplicira postojanje prethodno opisane prodomene. Neobično je važan kontekst zbivanja u kojem se ispoljava određeni afinitet [118].

Nakon slaganja liganda dolazi do aktivacije tip I kinaze fosforilacijom unutar jukstamembranskog područja citoplazmatske domene koja je bogata glicinskim i serinskim ostacima, konstitutivno aktivnom kinazom tip II. Smatra se da do aktivacije dolazi konformacijskom promjenom potaknutom vezanjem liganda. To je područje slabo poznato i zahtijeva daljnja istraživanja. Ipak, postoje određene informacije o BMP-2 i receptorima tip I (BRIa i BRIb, te BRII). Oni su odijeljeni u CCP (od engl. Clatrin coated pits) i DRM (od engl. detergent resistant membranes). DRM se dalje mogu klasificirati kao kaoveolarne i ne-kaveolarne frakcije. Kaveole su uvučenja membrane oblika boce koja su uključena u stanične procese poput prijenosa signala i endocitoze. Smatra se da je signalna kaskada BMP-2 ovisna o toj segregaciji, da do Smad-ovisnog prijenosa signala dolazi u DRM, uključujući kaveole [118].



Slika 5. *Regulacija na staničnoj membrani.* ***A*** *receptori i antagonisti u BMP signalizaciji. 1.monomerni ligandi se vežu na receptor i djeluju kao antagonisti dimernom BMP. 2. Postoje pseudo BMP receptori (BAMBI) koji vežu BMP no ne započinju signalizaciju, 3. Antagonisti BMPa međudjelovanjem s receptorima (A) ili BMPom (B) i blokiraju signalizaciju. 4. Vezanje BMPa na kompleks tipa I i tipa II receptora započinje signalizaciju. 5.Postoje i ko-receptori koji pojačavaju signalizaciju.* ***B*** *signalizacija jedinstvena za BMP-2. 1. BMP-2 uzrokoje grupiranje receptora na površini i daljnju signalizaciju..*Prilagođeno prema: Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell Signal. 2011;23:609-20. [118].

1.3.4. Prijenos signala

Aktivacija BMP signalnog puta započinje vezanjem BMP liganda za kompleks receptora tipa I i tipa II nakon čega receptor tipa I procesuira BMP signal u stanicu i pokreće jedan od dva signalna puta [120]. Unutar TGF-β nadobitelji prijenos signala se većinom prenosi putem Smad signalnog puta.

Iako dijele neka osnovna obilježja s ostalim članovima nadobitelji TGF-β, pleomorfne funkcije koje obavljaju članovi obitelji BMP zahtijevaju znatno složeniji signalni put .

Jedno od obilježja BMP je visok stupanj promiskuiteta prilikom vezanja na receptore i regulatore koje dijele s ostalim članovima nadobitelji TGF-beta. Zbog toga završni ishod prijenosa signala u velikoj mjeri ovisi o vremensko-prostornim obilježjima pri kojima je došlo do sekrecije BMP u cirkulaciju. Razumijevanje biološke aktivnosti BMP zahtijeva dobro poznavanje potencijalno preklapajućih puteva prijenosa signala [121,122].

BMP aktiviraju Smad-ovosne i brojne Smad-neovisne signalne puteve kojima direktno utječu na transkripciju gena. Aktivacija takvih signalnih puteva potječe od heteromernih kompleksa tip I i tip II serin/treonin kinaza receptora. Aktivacijski put ovisi o tipu I receptora koji se veže na ligand [120].

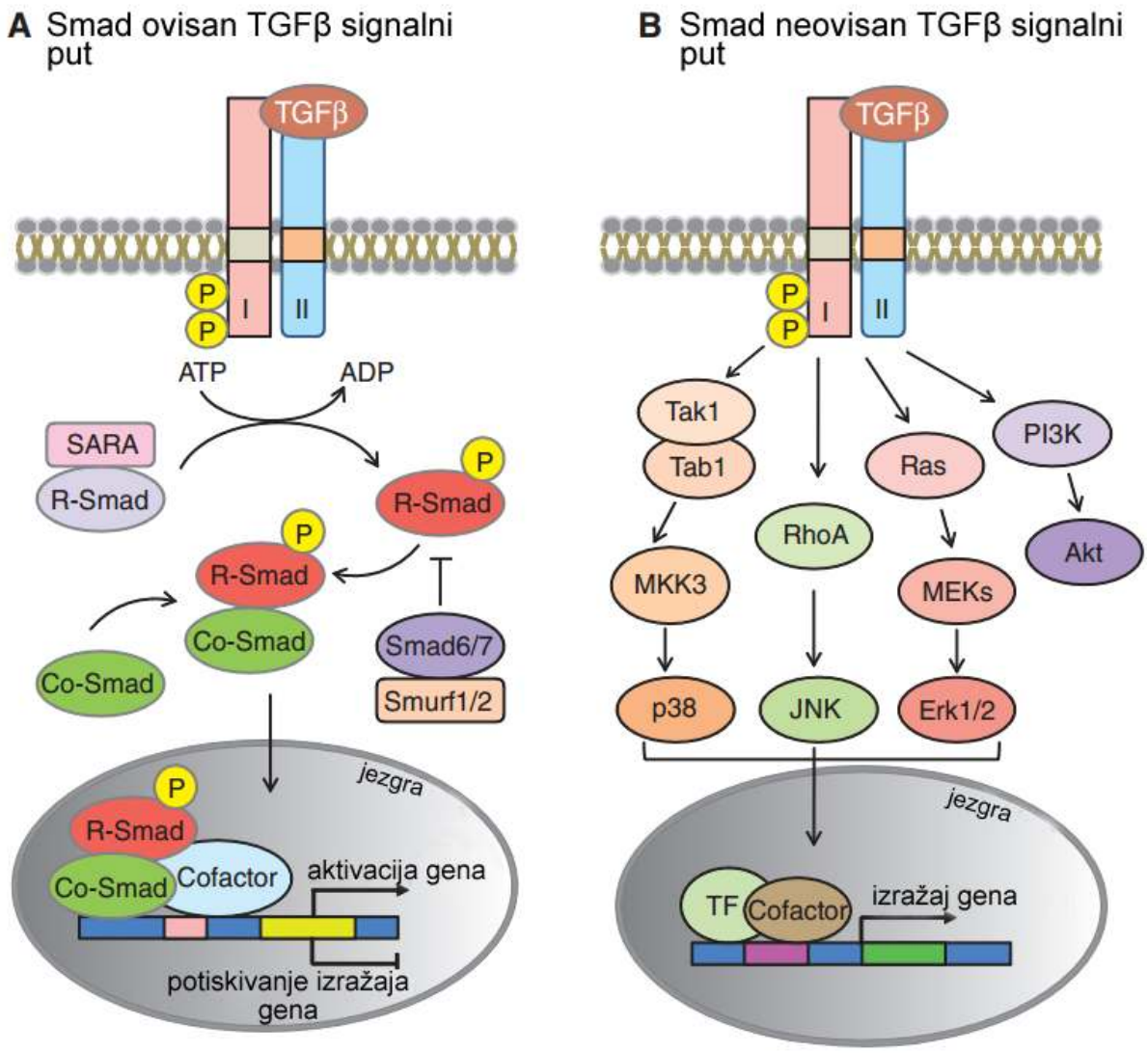
Smad ovisan put

Smad proteini se dijele u tri razreda: regulatorni Smad (R-Smad), obični Smad (co-Smad) i inhibitorni Smad (I-Smad). Dok su Co-Smad (Smad-4) i I-Smad (Smad-6 i Smad-7) uključeni i u TGF-beta i u BMP signalnim putevima, aktivirani tip I receptor nakon specifične aktivacije R-Smad razlikuje TGF-beta i BMP Smad-ovisan prijenos signala. Velika većina BMP aktivira Smad 1,5, i 8 bez selektivnosti zbog vezanja na receptor tip I, neki BMP (11 i 169 aktiviraju Smad2 i 3 zbog vezanja na TGFbeza receptore [120, 122]. Iako je Smad signalni put najbolje istražen, postoji još čitav niz nepoznanica poput primjerice mehanizma aktivacije i moguće endocitoze. Aktivirani tip I BMP receptora fosforilira Smad 1,5 ili 8 koji se spaja sa Smad 4 u jedan heterodimerski kompleks. Fosforilacija Smad 1, 5 ili 8 ovisi o vezanom ligandu. Taj

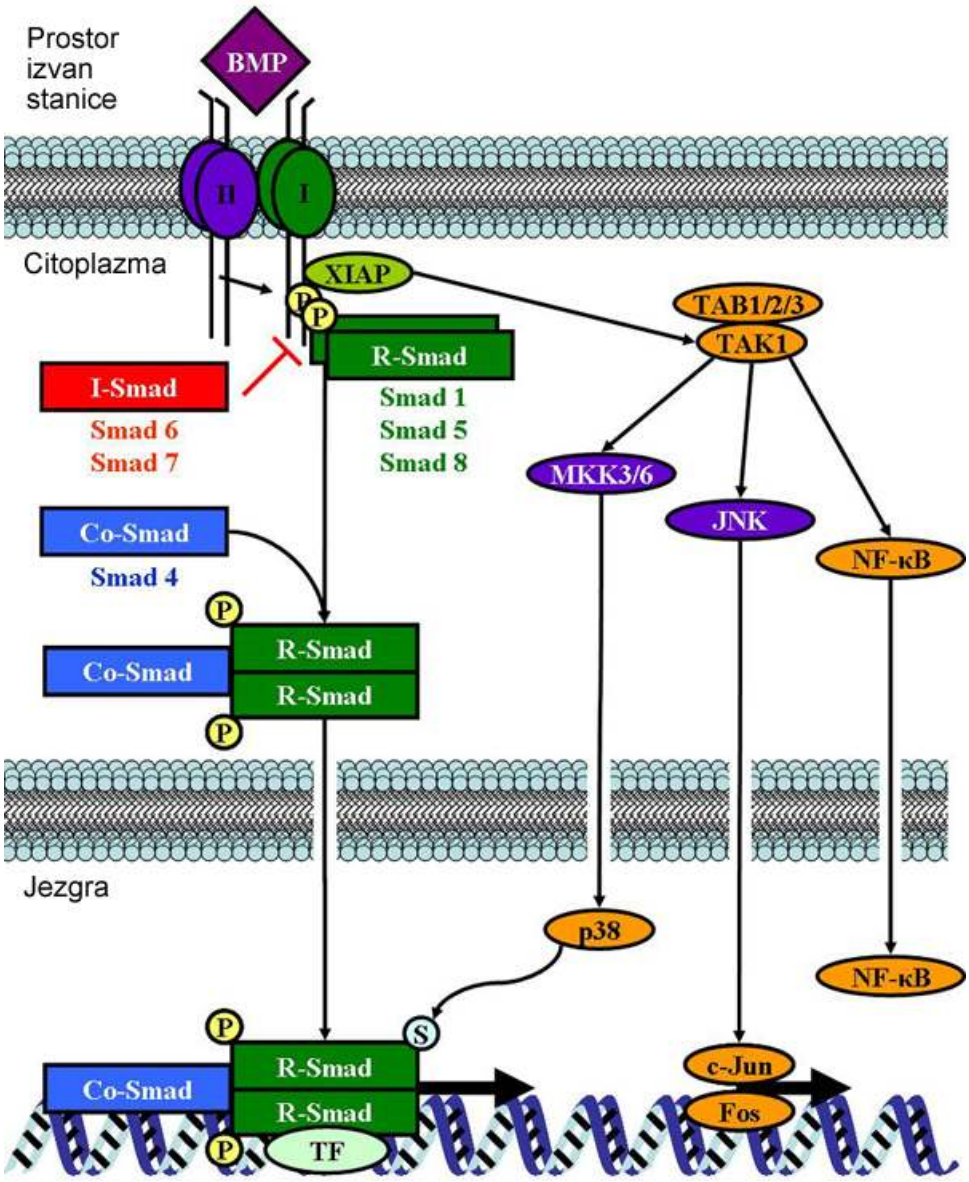
heterodimerski kompleks ulazi u jezgru i veže se za SME (od engl. Smad DNA binding element“), odnosno BRE (od engl. „BMP responsive elements“) koji regulira prijepis gena. Regulacijom prijepisa različitih gena BMP utječu na priliferaciju, diferencijaciju, morfogeneezi i apoptozu [120, 123].

Smad-neovisan put

Aktivirani kompleksi BRIa su sposobni pokrenuti druge signalne puteve poput izvanstanične signalom regulirane kinaze (ERK), map kinaze p38, C-jun N-terminalne kinaze (JNK), ERK i NFkappa B [124]. Smatra se da do aktivacije dolazi međudjelovanjem proteina BRAM1 (od engl. Bone morphogenetic protein receptor associated molecule 1) ili XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protin) i nizvodne signalne molekule (TAK1 (od engl. TGF-beta activated kinase 1) i TAB1 (TAK1 binding protin) s BRIa. BRAM1 se direktno veže s citoplazmatskim repom BRIa povezujući ga s TAB1 dok BRIa potiče XIAP u stvaranju veze s TAB1-TAK1 kompleksom. Međudjelovanje XIAP i TB1 je ključno za aktivaciju TAK1 [124].



Slika 6. *Unutarstanični prijenos signala Smad ovisnim i Smad neovisnim putem.*
Prilagođeno prema: Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. Cytokine Growth Factor Rew 2000; 11:15-22. [120].



Slika 7. *Unutarstanična signalizacija.*

Prilagođeno prema:Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. Cytokine Growth Factor Rew 2000; 11:15-*22. [120].*

Odabir prijenosa signala vrši se na temelju oligomerizacije BMP receptora. Kada postoji formirani receptorski kompleks signal se prenosi Smad signalnim putem. Smatra se da receptori tipa II određuju strukturu i organizaciju receptora tip I koje se u prisustvu receptora tip II

preformiraju i tvore heeterotetramerni kompleks koji dovodi do aktivacije Smad signalnog puta [124].

1.3.5. BMP antagonisti

Na učinak BMP utječe čitav niz različitih molekula koje mogu imati agonističko ili antagonističko djelovanje (tablica 7) .

Tablica 7. *Izvanstanični antagonisti BMP i njihovi ciljni proteini.*

BMP antagonist	BMP na koji djeluje
DAN	BMP-2, -4, GDF-5
Cerberus	BMP-4
Coco	Nije definirano
PRDC	BMP-2 i -4
Gremlin	BMP-2 i -4
USAG-1	BMP-7
Scleerostin	BMP-2, -4, -6, -7
Chordin	BMP-2 i BMP-4
Noggin	BMP-2, -4, -7
Follistatin	BMP-4, -7
Tsg	BMP-4

Prilagođeno prema Yanagita M. BMP antagonists: their role in developmeent and involvemeent in pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rew 2005; 16:309-17. [125]

1.3.6. BMP u razvoju bubrega

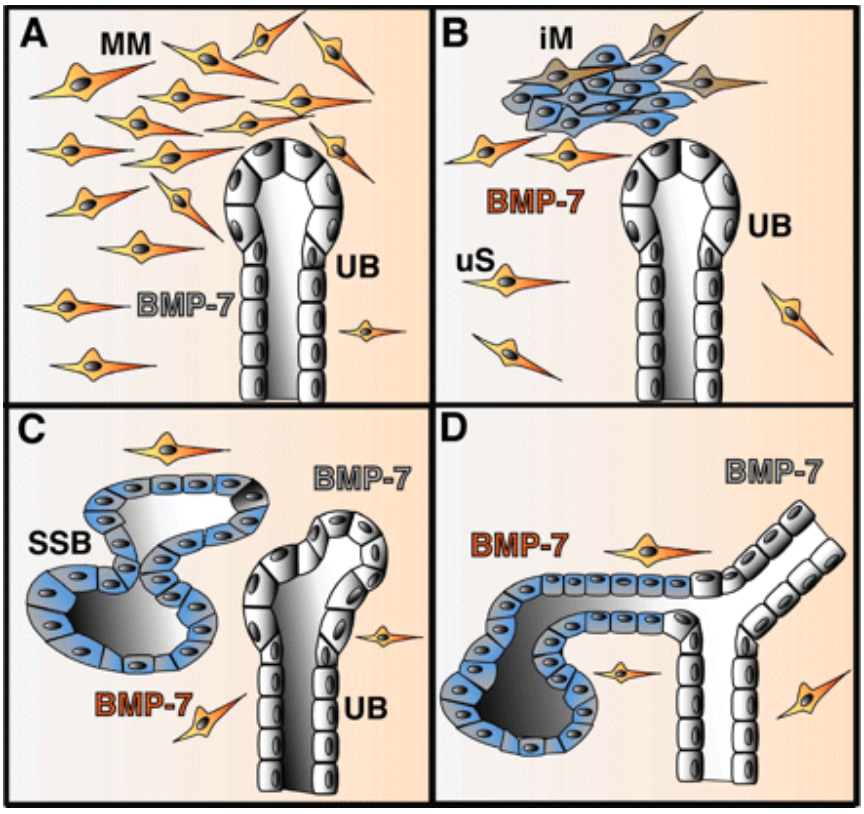
Metanefrički bubreg se razvija međudjelovanjem dviju različitih staničnih linija – epitela i mezenhima. Tijekom 5. tjedna gestacije u čovjeka i 10.5 dana u miša, dolazi do niza recipročnih induktivnih međudjelovanja između najkaudalnijeg izdanka Wolffovog kanala (ureterični pupoljak) i okolnog metanefričkog mezenhima. Ureterični pupoljak urasta u metanefrički mezenhima i započinje s grananjem, a istovremeno epitel ogranaka potiče kondenzaciju mezenhimskih satnica i njihovu konverziju u epitel. Nastaje renalna vezikula iz koje se ralje razvija tjelešce oblika zareza i izdužuje u tjelešce oblika slova S. Daljnjim izduljivanjem S-tjelešca kraj koji je najbliži ureteričnoj cijevi spaja se s istom formirajući distalni kanalić. Drugi kraj S tjelešca se dalje diferencira i nastaje proksimalni tubul, podociti glomerula i Bowmanova čahura. Pretpostavljene endotelne stanice invadiraju glomerul u razvoju stvarajući glomerularno kapilarno klupko. Takav ciklus ureteričnog grananja i indukcije nefrona rezultira stvaranjem otprilike 869 950 nefrona u čovjeka (raspon 227 327 - 1 825 380) [126].

Članovi obitelji koštanih morfogenetskih proteina sudjeluju u različitim stadijima razvoja bubrega. Vremensko-prostorni slijed izraženosti mRNK članova obitelji BMP, njihovih receptora i drugih glasnika upućuje na multiple funkcije tijekom razvoja bubrega.

BMP-2 i BMP-4 dijele 92% homologije u aminokiselinskom slijedu. Ipak, različita izraženost upućuje na različite uloge tijekom razvoja bubrega. BMP-2 prijepisi su izraženi u kondenziranom mezenhimu neposredno uz vrške granajućeg ureteričnog pupoljka. Nasuprot tome, BMP-4 je izražen u metanefričkom mezenhimu duž Wolffove cijevi prije početka razvoja bubrega, mezenhimu koji okružuje ureterični pupoljak prije invazije i mezenhimskim stanicama ureterični držak nakon završetka indukcije [127]. Bubrezi BMP-2 heterozigotnog miša izgledaju normalni, ali uz vidljivo pojačano grananje ureteričnog pupoljaka. To navodi na zaključak da BMP-2 inhibira granajuću morfogenezu na vršcima ureteričnog pupoljka. Nasuprot tome, BMP-4 heterozigotni miševi imaju čitav spektar abnormalnosti koje uključuju ipsilateralne uretere, ektopično pupanje uretera iz Wolfove cijevi, hidronefrozu, dvostruki sabirni sistem i displaziju bubrega različitog stupnja. Egzogeni BMP-4 inhibira granaje ureteričnog pupoljka [128]. Čini se da BMP-4 ima ulogu u ograničavanju mjesta i broja stvorenih ureteričnih pupoljaka [127]. Nedavno je otkrivena ključna uloga BMP-4 u morfogenezi uretera [129], što upućuje na ulogu BMP-4 u određivanju usmjerenja razvoja u ureter ili u sabirne cijevi tijekom organogeneze.

Prema tome bi hidronefrotički fenotip BMP-4 heterozigotnog miša bio posljedica gubitka usmjerenja sudbine prema ureteru uz gubitak glatkih mišićnih stanica u zidu proksimalnog uretera [130], nemogućnost diferencijacije prijelaznog epitela i ektopično pupanje uretera iz Wolfove cijevi.

Izraženost BMP-5 je ograničena na stromalni mezenhim uz ureter i bubrežni pelvis [127]. Miševi s inaktivirajkućom BMP-5 mutacijom razvijaju hidronefrozu [131, 132].
Nedostatak BMP-7 uzrokuje zastoj u razvoju bubrega nakon nastupa granajuće morfogeneze [133]. Zarobljeni razvoj je povezan s apoptozm mezenhimskih stanica. Miševi kojima je iz genoma izbačen BMP-7 umiru u slici uremije nakon okota [121].



Slika 8. Uloga BMP-7 u razvoju bubrega. A- Ureterični pupoljak (UB) inducira metanefrički mezoderm (MM). U ovoj fazi MBP-7 je u UB. B - inducirani mezenhim (iM) prolazi mezenhimsko epitelnu tranziciju (MET). C - epitel porijekla iM stvara tjelešca u obliku slova S (SSB). BMP-7 sudjeluje u pupanju UB, preživljavanju strome i diferencijaciji epitela. D - epitel porijekla MM stvara glomerul i većinu tubularnog sustava.
Prilagođeno prema: Dudley AT, Lyins KM i Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. Genes Dev 1995; 9:2795-2807 [132]

1.3.7. BMP u razvijenim bubrezima

U bubrezima odraslih štakora BMP-7 mRNA je izražena duž čitavog nefrona. Najsnažniji izražaj se ipak uočava u području kanalića vanjske medule, umjerena u kanalićima unutarnje medule, slabije u glomerulima, dok je jedva prisutna u korteksu. Snažna izraženost može se uočiti i u adventiciji renalnih arterija, te u epitelnim stanicama pijelona i uretera [133]. Malo je literaturnih podataka o izraženosti BMP u normalnom humanom bubregu. Analiza 6 bubrega je pokazala da je mRNA za BMP-7 najjače izražena u distalnom dijelu nefrona (distalni kanalići i sabirne cijevi), u glomerulima je jedva uočljiva (ne i imunohistokemijskim bojanjem), a u proksimalnim kanalićima se nije uspjelo dokazati izraženosti niti BMP-7 mRNA niti proteina [134]. Najjača izraženost metodom imunohistokemije uočena je u citoplazmi luminalne strane tubularnih epitelnih stanica. Luminalna distribucija upućuje na mogućnost izlučivanja mokraćom, što govori u prilog djelovanju BMP- u distalnim dijelovima nefrona.

Osim u razvoju bubrega, članovi BMP obitelji imaju ulogu i u održavanju strukture i funkcije bubrega u odrasloj dobi. Eksperimentalni modeli pokazuju da BMP-7 prevenira ishemijsko/reperfuzijsko oštećenje [135]. Primjena BMP-7 je smanjila područja nekroze i infarkta bubrega, životinje su imale slabiji upalni odgovor, a smanjen je i opseg apoptoze. BMP-7 smanjuje oštećenje bubrega i u drugim modelima akutnog zatajenja bubrega poput nefrotoksičosti žive ili cisplatine [121].

U kroničnom zatajenju bubrega BMP-7 dovodi do sporijeg rasta ureje i kreatinina u modelu 5/6 nefrektomije štakora [136], smanjuje oštećenje bubrega u modelu dijabetičke nefropatije uzrokovane streptozotocinom [137]. Djeluje stabilizirajući vaskularni fenotip stanica medije krvnih žila čime sprječava razvoj vaskularnih kalcifikacija u uremičara. Smanjuje razvoj uremijske osteodistrofije potičući aktivnost osteoblasta [138].

Rezultati dobiveni na životinjskim modelima pokazuju da BMP-7 ima značajan renoprotektivan učinak i samim time potencijalnu terapijsku primjenu u bolestima bubrega [136].

Koštani morfogenetski proteini imaju ulogu u razvoju različitih zloćudnih bolesti, pa tako i tumora mokraćnog sustava. Pokazano je da u tumorima svijetlih stanica dolazi do smanjivanja izraženosti BMP-7 što se povezuje s lošijom prognozom [139]. Također je pokazana snažna izraženost BMP-6 mRNA u 20 uzoraka normalnog tkiva bubrega te u svjetlostaničnom tipu karcinoma bubrega. Izraženost je bila jača u tumorskom tkivu, ali bez korelacije s preživljenjem i

kliničkopatološkim obilježjima ispitanika [139]. Yamasaki i sur. su prikazali zanimljiv slučaj bolesnice s karcinomom bubrega unutar kojeg je bila prisutna opsežna zona osifikacije. Pronašli su snažno izražen BMP-2 u citoplazmi tumorskih stanica, dok u drugim tumorim (koji nisu imali jezgre osifikacije) nisu uspjeli dokazati BMP-2. Autori pretpostavljaju da je do osifikacije došlo metaplazijom pluripotentnih matičnih stanica u osteoblaste uslijed parakrine sekrecije BMP-2 iz okolnih tumorskih stanica [140].

Zanimljivo je da različiti članovi obitelji imaju različite učinke u pojedinim vrstama tumora. Očigledno je da osim samog koštanog morfogenetskog proteina njegovo djelovanje u pojedinoj vrsti tumora određuje prisutnost drugih agonističkih ili antagonističkih molekula.

Tablica 8. *Terapijski učinak BMP-7 u životinjskim modelima humanih bolesti.*

Životinjski model	**Vrsta**	**Simulirana bolest čovjeka**	**Učinak BMP-7 terapije**	**Reference**
Ishemija/reperfuzija	Štakor	Akutna nekroza kanalića	Smanjena akutna ozljeda, ubrzan oporavak	[136]
Unilateralna opstrukcija uretera	Štakor	Opstruktivna nefropatija	Inhibicija tubularne atrofije i intersticijske fibroze	[141]
MRL$^{lpr/lpr}$	Miš	Lupus nefritis	Inhibicija tubularne atrofije i intersticijske fibroze	[142]
COL4A3$^{-/-}$	Miš	Alportov sindrom	Inhibicija tubularne atrofije i intersticijske fibroze	[142]
Nefrotoksični nefritis	Miš	Akutni glomerulonefritis	Regresija tubulointersticijskog oštećenja	[143]
Streptozotocin induciran dijabetes	Štakor	Dijabetička nefropatija	Regresija hipertrofije bubrega, poboljšanje histologije glomerula, bolja GF	[144]

2. HIPOTEZA I CILJ RADA

2.1. HIPOTEZA

Postoji razlika uzorka izražaja koštanih morfogenetskih proteina u tkivu kirurški uklonjenog presatka i zdravom tkivu bubrega.

Postoji veza izražaja koštanih morfogenetskih proteina i uzroka poremećaja funkcije presatka koji je indikacija za kirurško uklanjanje.

2.2. CILJ RADA

2.2.1. Opći cilj

Opći cilj rada je ispitati povezanost uzorka izražaja koštanih morfogenetskih proteina i uzroka poremećaja funkcije presatka i posljedičnog kirurškog odstranjenja.

2.2.2. Specifični ciljevi

Opći cilj uključuje ostvarivanje posebnih ciljeva:

1. odrediti opće karakteristike populacije bolesnika kojima je učinjeno kirurško uklanjanje presatka
2. odrediti izražaj BMP 2 u uzorcima kirurški uklonjenih presadaka bubrega postupkom imunohistokemijskog bojanja
3. odrediti izražaj BMP 4 u uzorcima kirurški uklonjenih presadaka bubrega postupkom imunohistokemijskog bojanja
4. odrediti izražaj BMP 6 u uzorcima kirurški uklonjenih presadaka bubrega postupkom imunohistokemijskog bojanja
5. odrediti izražaj BMP 7 u uzorcima kirurški uklonjenih presadaka bubrega postupkom imunohistokemijskog bojanja
6. na osnovi dobivenog uzorka izražaja proteina BMP i analize karakteristika populacije pretpostaviti njihovu ulogu u poremećaju funkcije presatka koji rezultira kirurškim uklanjanjem presadaka.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. ISPITANICI

U istraživanje je uključeno 50 bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrežne funkcije, kojima je presađen bubreg. Istražili smo tkivo 50 bubrežnih presadaka koji su kirurški uklonjeni iz bolesnika zbog različitih indikacija nakon transplantacije. U našoj ustanovi indikacija za kirurško uklanjanje presatka je stanje bolesnika u kojem presadak uzrokuje kliničke simptome poput hipertenzije, anemije neosjetljive na liječenje eritropoetinom. Indikaciju za kirurško uklanjanje predstavljaju i akutno odbacivanje funkcionirajućeg presatka koje se ne smije liječiti pojačanom imunosupresijom u bolesnika sa visoko-ugrožavajućim infekcijama ili akutno odbacivanje u bolesnika koji su se nakon zatajivanja funkcije vratili na dijalizu (tablica 9).

Tablica 9. *Kliničke indikacije za kirurško uklanjanje presadaka bubrega.*

Klinička indikacija	N (%)
kronična disfunkcija presatka	17 (34%)
infekcija primatelja	10 (14%)
tromboza a. ili v. bubrega	5 (10%)
afunkcija presatka	3 (6%)
krvarenje	3 (6%)
akutno odbacivanje	2 (4%)
anomalije krvnih žila	3 (4%)
povrat osnovne bolesti	2 (4%)
akutno odbacivanje	2 (4%)
tumor pijelona	2 (4%)
hiperakutno odbacivanje	1 (2%)

a ili v. bubega- arterija ili vena bubrega; k.ž krvne žila;

Osnovni podaci (dob, spol, osnovna bolest bubrega, vrijeme provedeno na dijalizi do transplantacije bubrega, postojanje protutijela na virus hepatitisa B i C, protokol imunosupresivnog liječenja, patohistološki nalaz biopsije bubrega prije kirurškog uklanjanja presatka) prikupljeni su pregledom povijesti bolesti bolesnika u Klinici za unutarnje bolesti. Prosječna dob bolesnika u trenutku transplantacije bila je 39.9±2.2 godina. Bolesnici su liječeni

dijalizom prosječno 5.7±0.7 godina prije transplantacije, a ostale karakteristike istraživane populacije navedene su u tablici 10.

Tablica 10. *Karakteristike ispitivane populacije.*

		N (%)
Spol	Muški	26 (52%)
	ženski	24 (48%)
Druga transplantacija		3 (6%)
Treća transplantacija		2 (4%)
Kronični hepatitis B		5 (1%)
Kronični hepatitis C		2 (4%)
Osnovna bolest bubrega		
Kronični GNF bez biopsije		11 (22%)
VUR		5 (10%)
FSGS		4 (8%)
policistoza		4 (8%)
lupus nefropatija		4(8%)
IgA nefropatija		2 (4%)
bubrežni kamenci		2 (4%)
nepoznato		4 (8%)
Ostalo		14 (28%)

GNF glomerulonefriti; VUR veziokouretralni refluks;
FSGS fokalna segmentalna glomeruloskleroza

Podaci o darivatelju bubrega (dob, spol, uzrok smrti, HLA podudarnost darovatelja i primatelja presatka) prikupljeni su pregledom arhive Zavoda za tipizaciju tkiva pri Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku.

Prosječna dob darivatelja bubrega bila 48.4±2.4 godine. Trideset i jedan je bilo darivatelja i 12 darivateljica, za 7 darivatelja podatak o spolu nije bio dostupan. Četrdeset osam presadaka bilo je od preminulog darivatelja sa kucajućim srcem, a 2 presatka su od živog srodnog darivatelja. Uzrok smrti je poznat za 22 darivatelja i naveden je u tablici 11. Najveći broj bolesnika, njih 62% imalo je 2 ili 3 HLA nepodudarnosti (tablica 12). Stupanj HLA nepodudarnosti je iznosio u prosjeku 2,6 ± 0,1.

Tablica 11. *Uzrok smrti darivatelja.*

Uzrok smrti	N
Subarahnoidalno i intracerebralno krvarenje	13
Neurotrauma	5
Cerebrovaskularni inzult	2
Kardiorespiratorni arest	1
Tumor statoakustičkog živca	1

Tablica 12. *Broj bolesnika prema broju HLA nepodudarnosti.*

Broj HLA nepodudarnosti	N(%)
0	0 (0%)
1	6 (12.5%)
2	15 (31.3%)
3	21 (43.8%)
4	6 (12.5%)
5	0 (0%)

Za 44 bolesnika je poznato imunosupresivno liječenje. Sedamnaest bolesnika je primilo indukcijsku imunosupresiju. Indukcijska imunosupresija se sastojala od mišjih monoklonskih protutijela na alfa lanac IL2 receptora T limfocita (antiCD25) ili antitimcitnog globulina, ili antilimfocitnih monoklonskih protutijela (OKT3). Zastupljenost pojedinih protutijela prikazana je u tablici 13.

Tablica 13. *Indukcijska imunosupresivna terapija.*

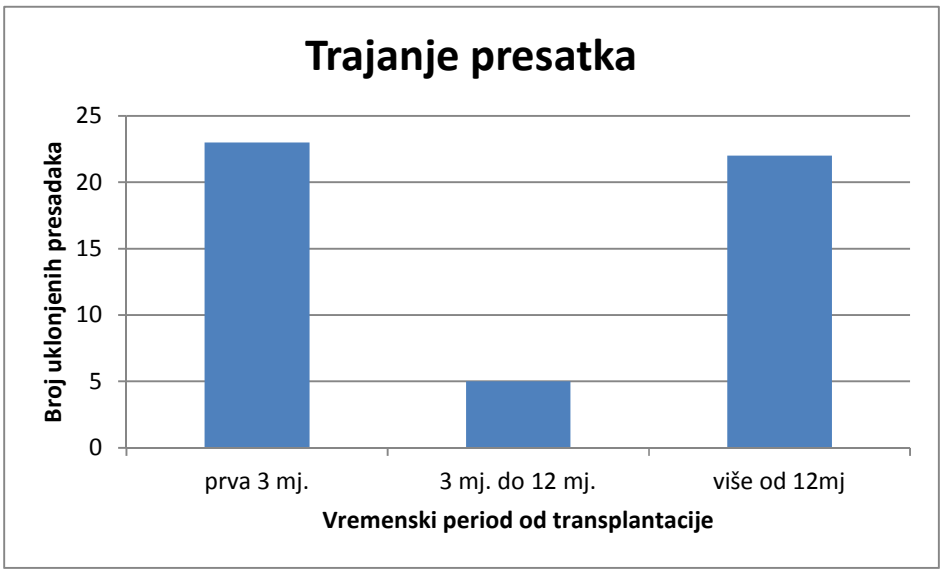
Indukcijska terapija:	N
anti CD25	13
ATG	3
OKT3	1

U protokolu imunosupresivne terapije održavanja jedan bolesnik je primao dvojnu terapiju ciklosporinom i kortikosteroidima dok su svi ostali bolesnici uzimali trojnu imunsupresivnu terapiju. Četrdeset i jedan bolesnik je započeo liječenje ciklosporinom, kortikosterodima i mikofenolat mofetilom ili azatioprinom, u 6 bolesnika je ciklosporin promijenjen u takrolimus. Dvoje bolesnika je liječeno takrolimusom, mikofenolat mofetilom i kortikosteroidima, a u samo jednog bolesnika je takrolimus zamijenjen sirolimusom, što je prikazano u tablici 14.

Tablica 14. *Shema imunosupresivnog liječenja.*

Shema imunosupresije		N
Ciklosporin + kortikosteroid +	MMF	26
	Azatioprin	5
	Azatioprin → MMF	4
Ciklosporin A→ takrolimus + kortikosteroid +	MMF	6
Takrolimus +kortikosteroid +	MMF	2
Takrolimus → sirolimus+ kortikosteroid	MMF	1

Analizom dužine vremenskog perioda od dana transplantacije do dana kirurškog uklanjanja presatka uočeno je da je u prva tri posttransplantacijska mjeseca kirurški uklonjeno 44,9% presadaka, a u razdoblju nakon prve godine od transplantacije 42.9% presadaka (Slika 9), u 13 bolesnika (26.5%) ovaj vremenski period je bio duži od 5 godina.



Slika 9. *Trajanje presatka.*

Iz patohistološkog nalaza uklonjenih presadaka odredili smo stupanj odbacivanja prema klasifikaciji iz Banffa iz 2007.

Tablica 15. *Zastupljenost kliničkih indikacija i patohistoloških nalaza u navedena 3 vremenska perioda.*

Klinička indikacija	N	Vremenski period (mjeseci)	PHD	N
Infekcija primatelja	7	Do i uključivo 3 mjeseca	Infarkt bubrega	5
Tromboza arterije ili vene bubrega	5		TCMR IIb + infarkt bubrega	4
Krvarenje	3		Krvarenje	3
Afunkcija presatka	3		Pijelonefritis	3
Akutno odbacivanje	2		TCMR IIb	2
Aneurizma bubrežne arterije	2		Hiperakutno odbacivanje	1
Hiperakutno odbacivanje	1		Granične promjene	1
			TCMR IIa + IFTA III	1
			IFTA I	1
			Nespecifične promjene	1
			Bubrežni parenhim bez promjena	1
Infekcija primatelja	2	Duže od 3 mjeseca i kraće od 12 mjeseci	FSGS	1
Povrat osnovne bolesti	2		FSGS +TCMR IIb	1
Hematurija	1		Fabry	1
			TCMR IIa + IFTA II	1
			TCMR III + IFTA III	1
Kronična disfunkcija presatka	17	Duže od i uključivo 12 mjeseci	IFTA III +TCMR IIb	7
Tumor odvodnog sustava bubrega	2		IFTA III	1
Akutno odbacivanje	2		IFTA III +FSGS	1
Infekcija primatelja	1		IFTA II + TCMR Ia	1
			IFTA II + TCMR IIa	1
			IFTA II+ TCMR IIb	1
			IFTA II	1
			IFTA I	1
			IFTA I + TCMR IIa	1
			Nespecifične promjene	2
			TCMR IIb+ infarkt bubrega	2
			TCMR IIb	1
			Tumor pijelona	1

TCMR- akutno T stanično odbacivanje; FSGS- fokalna segmentalna glomeruloskleroza; IFTA – intersticijska fibroza i tubularna atrofija.

3.2. Postupci

Uzorci tkiva ispitivane skupine dobiveni su kirurškim uklanjanjem presadaka bubrega. Indikacije za kirurško uklanjanje bubrežnih presadaka navedene su u tablici 9.

Kontrolna skupina su uzorci zdravog tkiva bubrega, dobiveni nefrektomijom bolesnika s lokaliziranim tumorom bubrega. Kontrolnu skupinu činilo je 12 uzoraka, prosječna dob bolesnika iznosila je 58,8 ± 4,3 godine, 67% činili su muškarci. Za analizu je korišteno tkivo uzeto s najudaljenijeg mjesta od sijela tumora.

Odmah nakon što je bubreg izvađen iz tijela ekscidirano je tkivo veličine 1x1x1 cm^3. Uzorci tkiva fiksirani su u 10% puferiranom formalinu, dehidrirani u rastućem nizu alkohola, provedeni kroz ksilol i uklopljeni u parafin na 60^oC.

3.2.1. Imunohistokemijsko bojanje

Imunohistokemijsko određivanje prisutnosti proteina temelji se na reakciji specifičnog vezanja protutijela na antigene prisutne u tkivima. Proteini BMP 2, BMP 4, BMP 6 i BMP 7 su antigeni u tkivu bubrega na koje se vezalo antigen specifično primarno protutijelo. Nakon vezanja slijedi vizualizacija primarnog protutijela biotiniranim sekundarnim protutijelom na koje se veže streptavidin označen peroksidazom hrena. Slijedi inkubacija sa bojom koja je substrat za peroksidazu.

Postupak imunohistokemijskog određivanja uzorka izražaja u parafinskim uzorcima sastoji se od nekoliko koraka. Iz parafinskih blokova izrezani su rezovi debljine 4-5µm. Rezovi su potom montirani na staklo, deparafinirani u ksilolu i rehidrirani u silaznom nizu alkohola . Razotkrivanje antigena učinjeno je u PT LINK-u, pri čemu je korišten pufer „3 in 1“ Dako pH 9.0, na maksimalnoj temperaturi od 97 ^oC kroz 20 minuta. Potom su uzorci isprano u puferu EnVision FLEX Wash Buffer pH 7.6.

Uzorci su inkubirani sa primarnim monoklonskim protutijelom (R&D systems) koje se vezalo na ljudske BMP-7 na sobnoj temperaturi kroz 60 minuta, u razrijeđenju 1:1000.
Za prikaz izražaja BMP-6 uzorci su inkubirani sa mišjim monoklonskim protutijelom (Abcam) koje se vezalo na ljudske BMP-6 u tkivu na sobnoj temperaturi kroz 60 minuta u razrjeđenju

1:100. Također uzorci su inkubirani sa monoklonskim protutijelom koje se vezalo za ljudski BMP-2 (R&D systems), na sobnoj temperaturi kroz 60 minuta u razrjeđenju 1:100.
Zečja poliklonska protutijela (Abcam) su se vezala na ljudske BMP-4 na sobnoj temperaturi kroz 60 minuta.

Endogena peroksidazna aktivnost u tkivu blokirana je 3% vodikovim peroksidom (En Vision FLEX K8010) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizualizaciju korišteno je vezno protutijelo EnVisiol FLEX/HRP, koje je inkubirano 30 minuta na soboj temperaturi i potom inkubirano s kromogenom EnVision FLEX/DAB i Chromogen- K8010 kroz 10 minuta na sobnoj temperaturi. Rezultirajuća pozitivna reakcija je bila smeđe boje. Stakalca su potom kontrastno obojena hematoksilinom. Cijeli postupak imunohistokemijskog bojanja je proveden u aparatu Autostain Dako. Dako Autostainer je automatizirani sustav za bojanje preparata parafinskih ili smrznutih rezova, citoloških uzoraka i razmaza stanica. Sastoji se od integriranje aparature za bojanje i programske podrške koja sa prikladnim reagensima omogućava automatizirano imunohistokemijsko i imunocitokemijsko bojanje.

3.2.2. Mikroskopiranje

Svi preparate bojane imunohistokemijskom metodom su mikroskopirala 2 mikroskopičara, a izražaj koštanih morfogenetskih proteina je procijenjen semikvantitativnom metodom. Uzorci su bodovani prema raspodjeli pozitivnih stanica. Raspon bodova kreće se od 0 do +++, prema protokolu: +++ više od 75 % stanica je pozitivno; ++ 50-74% pozitivnih stanica; 1+ 10-49 % pozitivnih stanica; i 0 ako je < 10 % stanica pozitivno. Analizirano je 500 stanica svakog uzorka u 8 polja pri povećanju x 400.

3.2.3. Etički aspekti istraživanja

Tijekom istraživanja osigurano je poštivanje temeljnih, etičkih i bioetičkih principa, a u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Svi podaci su bili prikupljeni u skladu s etičkim i bioetičkim principima, te je osigurana privatnost (medicinska tajna) bolesnika uključenih u istraživanje kao i zaštita tajnosti podataka.

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

3.2.4. Statistička obrada podataka

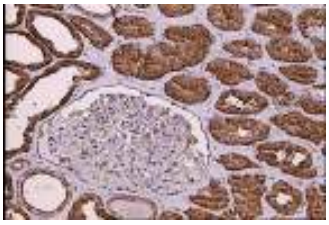
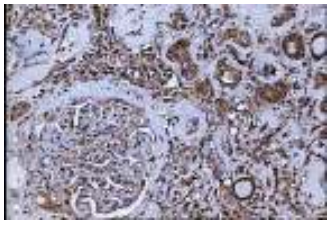
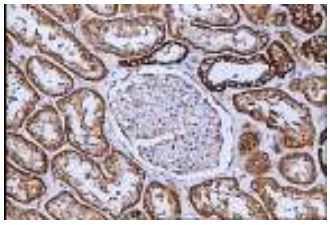
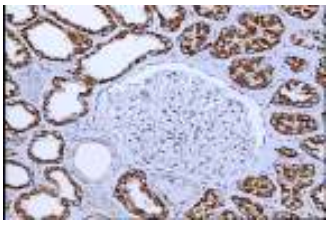
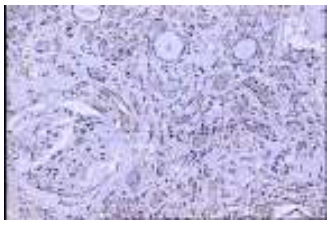
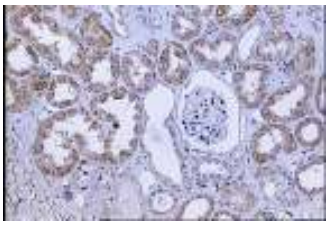
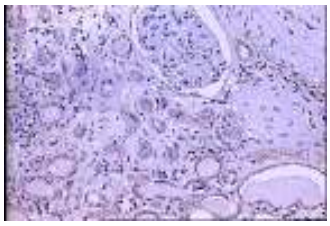
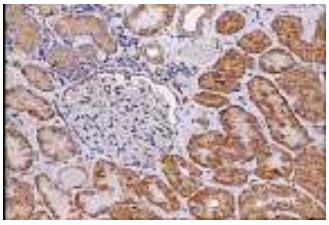
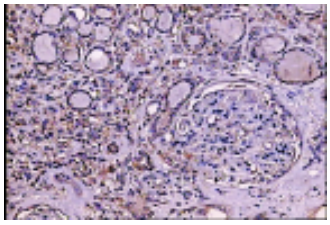
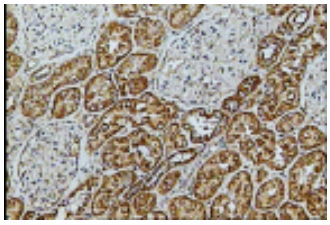
Rezultati su prikazani kao apsolutne vrijednosti, postotci frekvencija, srednje vrijednosti i standardne pogreške srednje vrijednosti. Fisherov egzaktni test je korišten za usporedbu kategoričkih varijabli (usporedba izražaja BMP-a). Studentov T test je korišten pri usporedbi kontinuiranih varijabli. Vrijednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom. Statistička obradu podataka je učinjena upotrebom računalnog programa Statistica 8 (StatSoft., Inc., Tulsa, OK, USA) i programa za računanje Fisherovog exact testa 2x3 dostupnog putem poveznice na stranicama Sveučilišta Delaware (http://udel.edu/~mcdonald/statfishers.html)

4. REZULTATI

4.1. Imunohistokemijsko bojanje

Imunohistokemijskom metodom pokazan je izražaj BMP-2, BMP-4, BMP-6 i BMP-7 u tkivu kirurški uklonjenih presadaka bubrega i u normalnom bubregu (tablica 16).

Tablica 16. *Izražaj BMP-a u presađenom i normalnom tkivu bubrega.*

Kirurški uklonjeni presadak bubrega		Zdravi bubreg	BMP
Trajanje presatka ≤ 3 mjeseca	Trajanje presatka ≥ 12mjeseci		
			BMP-2
			BMP-4
			BMP-6
			BMP-7

U normalnom tkivu bubrega pokazan je podjadnak vrlo snažan izražaj BMP-2 u citoplazmi svih vrsta kanalića kore i srži. Također BMP-2 je bio pozitivan i u stanicama Bowmanove čahure. Opisani izražaj BMP-2 može se vidjeti u tablici 16.

U zdravom tkivu bubrega BMP-4 nije izražen u stanicama bubrežnih glomerula i Bowmanove čahure. Jak izražaj BMP-4 uočen je u citoplazmi epitelnih stanica proksimalnih kanalića, dok je izražaj u epitelnim stanicama distalnih kanalića i kanalića medule bio zamjetno slabiji. Izražaj BMP-4 u zdravom tkivu bubrega i njegova specifičanost vidljivi su u tablici 16.

BMP-6 nije detektiran u stanicama glomerula niti Bowmanove čahure u normalnom bubrežnom tkivu, vrlo slab izražaj je uočen u epitelnim stanicama proksimalnih, distalnih i medularnih kanalića. Izražaj BMP-6 se nije razlikovao između pojedinih vrsta kanalića. Ovakav vrlo slab izražaj BMP-6 u zdravom tkivu bubrega je vidljiv u tablici 16.

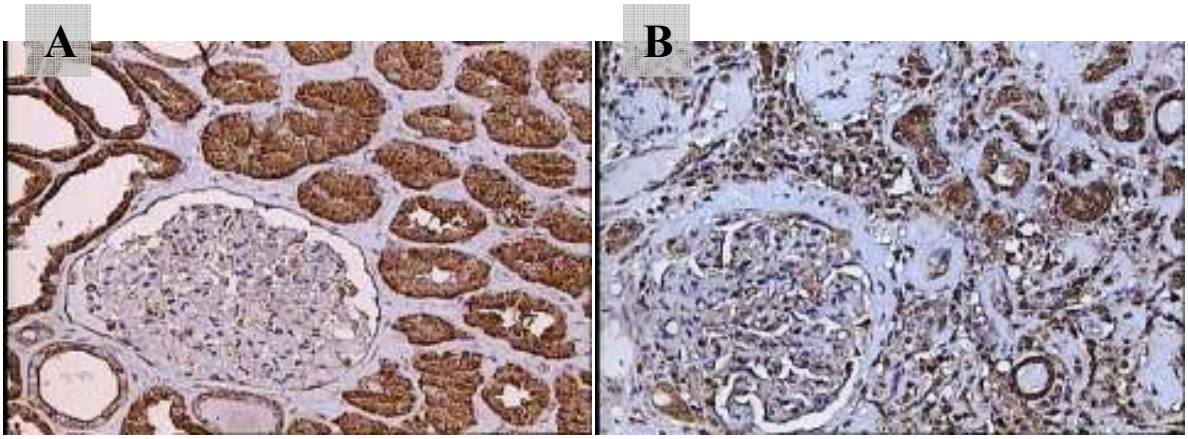
Jak izražaj BMP-7 u normalnom tkivu bubrega je uočen u citoplazmi epitelnih stanica proksimalnih, distalnih i kanalića srži, BMP- 7 nije uočen u stanicama Bowmanove čahure niti u stanicama glomerula. Izražaj BMP-7 se uočava u tablici 16.

4.1.1. Izražaj BMPa s obzirom na duljinu trajanja presatka

U tablici 16 se može uočiti da postoji razlika u jačini izražaja BMP-4, BMP-6 i BMP-7 s obzirom na vrijeme koje je proteklo od transplantacije do kirurškog uklanjanja presatka. U uzoraka bojanih na BMP-2 nije uočena razlika u jačini izražaja s obzirom na vrijeme koje je proteklo od transplantacije do kirurškog uklanjanja. Kako je u prva tri posttransplantacijska mjeseca kirurški uklonjeno 44,9% presadaka, a u razdoblju nakon prve godine od transplantacije njih 42.9%, izražaj BMP-a je uspoređen u ove dvije skupine uzoraka međusobno i sa kontrolnom skupinom zdravog bubrežnog tkiva.

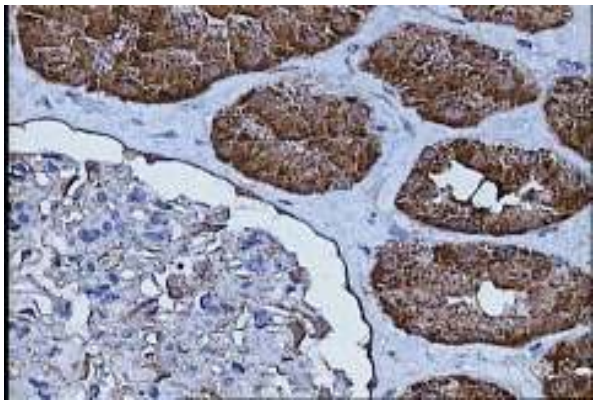
4.1.2. BMP-2

Izražaja BMP-2 u uzorcima tkiva bubrega koji su bili transplantirani 3 mjeseca i duže od 12 mjeseci prikazan je na slici 10.



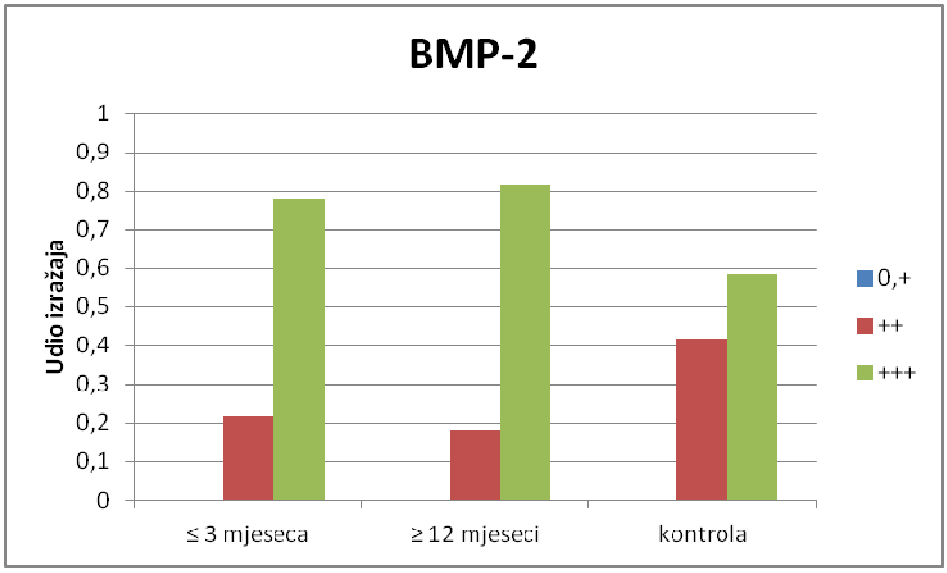
Slika 10. *A - izražaj BMP-2 u tkivu transplantiranog bubrega u vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja iznosilo je 72 dana. B – BMP-2 u tkivu transplantiranog bubrega u vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja iznosilo je 5,1 godinu. Povećanje 20x.*

BMP-2 je podjednako izražen u citoplazmi svih epitelnih stanica bubrežnih kanalića, bez obzira na dužinu trajanja presatka. Većina uzoraka imala je jakost izražaja ++ ili +++ bez obzira na vrijeme koje je proteklo od transplantacije. Također nije uočena statistički značajna razlika u izražaju BMP-2 u ispitivanim skupinama i u kontrolnoj skupini (slika 12). BMP-2 je bio pozitivan u citoplazmi stanica Bowmanove čahure transplantiranih bubrega, što se može uočiti na slici 11.



Slika 11. *Izražaj BMP-2 u tkivu transplantiranog bubrega, BMP-2 pozitivan u citoplazmi stanica Bowmanove čahure*

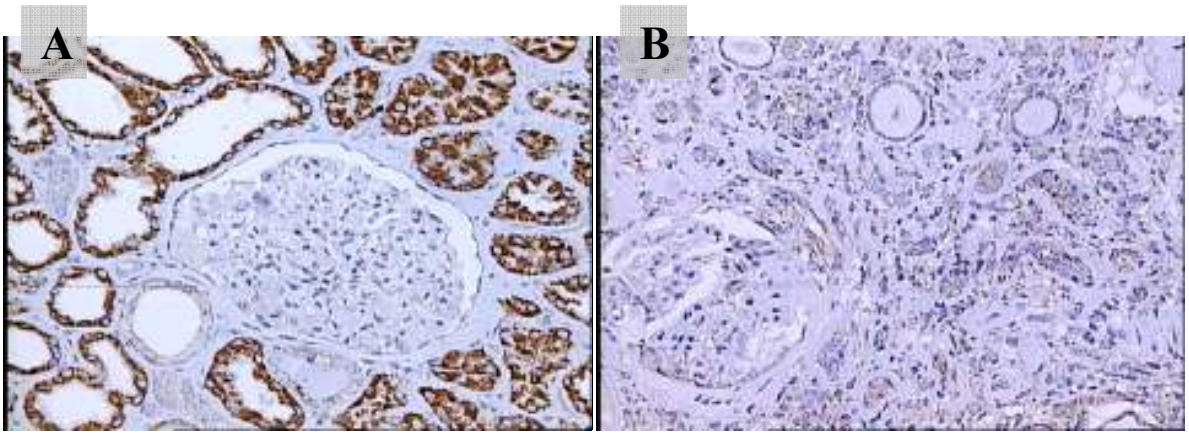
BMP-2 je bio pozitivan u Bowmanovoj čahuri 74% uzoraka koji su bili transplantirani 3 mjeseca i u 65% uzoraka transplantiranih dulje od 12 mjeseci.



Slika 12. *Izražaj BMP-2 u uzorcima tkiva bubrega s obzirom na vremenski period koji je protekao od transplantacije do kirurškog uklanjanja. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP-2 0, +, ++ ili +++ ovisno o vremenskom periodu proteklom od transplantacije . Vremenski period je podijeljen na prva 3 mjeseca od transplantacije i na više od 12 mjeseci od transplantacije.*

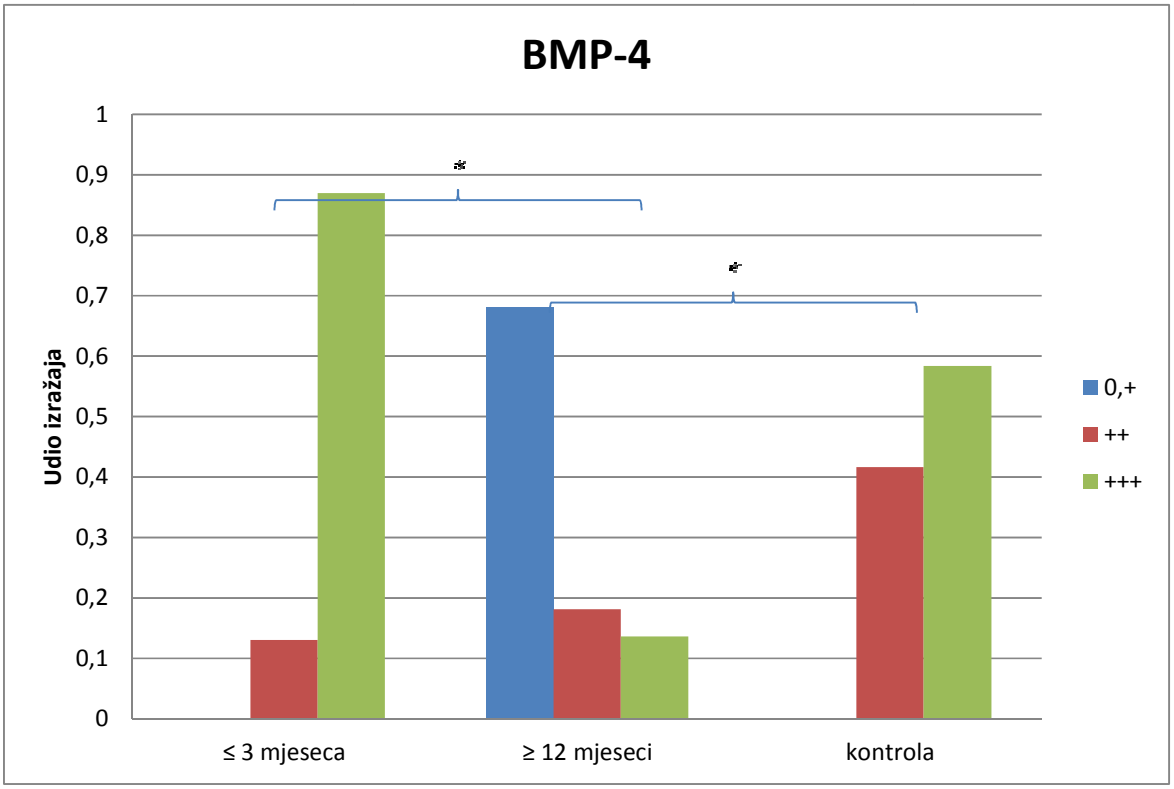
4.1.3. BMP-4

Na slici 13A je prikazan izražaj BMP-4 u uzorcima transplantiranih bubrega. U tkivu bubrega transplantiranih do 3 mjeseca uzorak izražaja BMP-4 bio je vrlo sličan izražaju u kontrolnoj skupini. BMP-4 je bio jako pozitivan u citoplazmi stanica proksimalnih kanalića, a slabije izražen u distalnim i kanalićima srži. U uzorcima tkiva bubrega koji su bili transplantirani duže od 12 mjeseci BMP-4 je bio slabije izražen u svim epitelnim stanicama bubrežnih kanalića.



Slika 13. *A - izražaj BMP-4 u tkivu transplantiranog bubrega, vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja je iznosilo 72 dana. B - izražaj BMP-4 u tkivu transplantiranog bubrega, vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja je iznosio 5,1 godina. Povećanje 20x.*

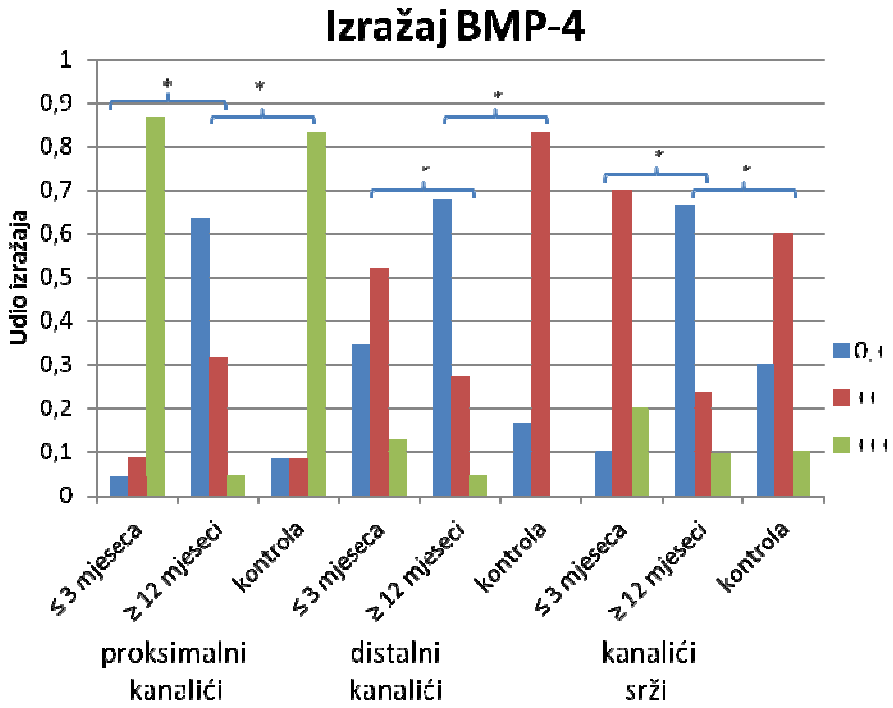
Uočen je statistički značajno veći udio uzoraka sa jačinom izražaja ++ i +++ u tkivu bubrega transplantiranih do 3 mjeseca u odnosu na uzorke bubrega transplantirane duže od 12 mjeseci ($p<0.001$; (4.00E-08)). Ova razlika u izražaju BMP-4 je prikazana na slici 14. Također statistički je značajno slabiji izražaj BMP-4 u uzorcima koji su kirurški uklonjeni nakon 12 mjeseci u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0.001$; (1.80E-04)). Nije nađena značajna razlika izražaja BMP-4 u skupini uzoraka uklonjenih u prva 3 mjeseca i kontrolnoj skupini.



Slika 14. *Izražaj BMP-4 u uzorcima tkiva bubrega s obzirom na vremenski period koji je protekao od transplantacije do kirurškog uklanjanja. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP-4 0, +, ++ ili +++ ovisno o vremenskom periodu proteklom od transplantacije i u kontrolnoj skupni. Vremenski period je podijeljen na prva 3 mjeseca od transplantacije i na više od 12 mjeseci od transplantacije. Statistički značajna razlika između uzoraka je označena sa *.*

Usporedbom izražaja BMP-4 u pojedinim kanalićima bubrežnog parenhima, uočen je jak izražaj BMP-4 u citoplazmi epitelnih stanica proksimalnih kanalića u uzorcima koji su uklonjeni u prva 3 mjeseca od transplantacije. U uzorcima tkiva bubrega uklonjenih u prva 3 mjeseca od transplantacije statistički je značajno veći udio uzoraka imao stanice proksimalnih kanalića izražaja +++ u odnosu na njihov udio u uzorcima bubrega transplantiranih duže od 12 mjeseci (tablica 17). U citoplazmi distalnih stanica bubrega uklonjenih u prva 3 mjeseca od transplantacije BMP-4 je statistički značajno jače izražen i u odnosu na izražaj u epitelnim stanicama distalnih kanalića uzoraka uklonjenih nakon 12 mjeseci (tablica 17). Udio uzoraka tkiva bubrega transplantiranih 3 mjeseci u kojih je BMP-4 izražen ++ i +++ u stanicama kanalića srži bio je statistički značajno veći od njihovog udjela u uzorcima tkiva bubrega transplnatiranog

dulje od 12 mjeseci (tablica 17). Na slici 15 prikazani su udjeli uzoraka bubrežnog tkiva izražaja BMP-4 0,+, ++ i +++ u pojedinim kanalićima bubrežnog parenhima.



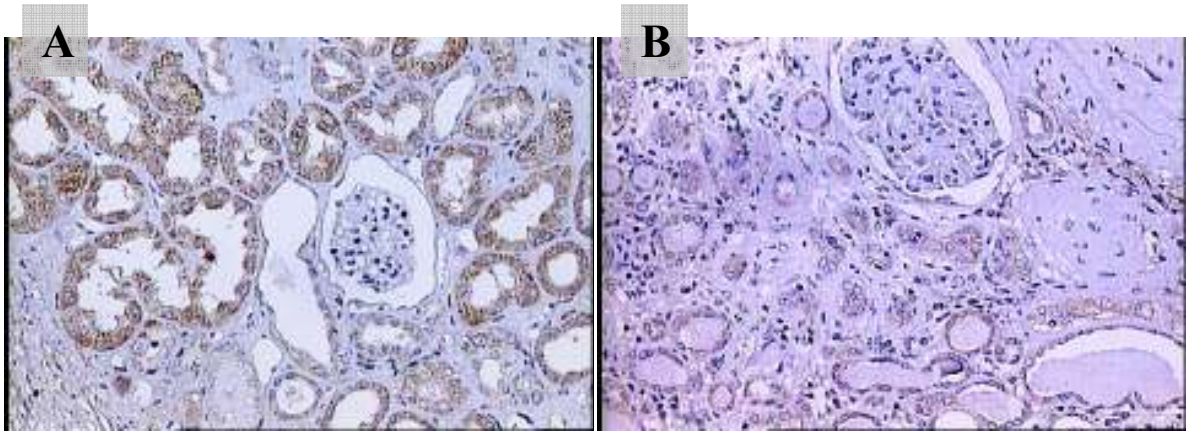
Slika 15. *Izražaj BMP-4 u uzorcima tkiva bubrega s obzirom na vremenski period koji je protekao od transplantacije do kirurškog uklanjanja. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP-4 0, +, ++ ili +++ u proksimalnim, distalnim i kanalićima srži ovisno o vremenskom periodu proteklom od transplantacije i u kontrolnoj skupini. Vremenski period je podijeljen na prva 3 mjeseca od transplantacije i na više od 12 mjeseci od transplantacije. Statistički značajna razlika između uzoraka je označena sa *.*

Tablica 17. *Tablica p vrijednosti za BMP-4.*

	P		
	proksimalni kanalići	distalni kanalići	kanalići srži
≤ 3 mj. prema ≥ 12mj.	<0.001 (6,98E-09)	0,079	0,001
≤ 3 mj. prema kontrola	1	0,200	0,491
≥ 12mj. prema kontrola	<0.001 (6,5E-06)	0,003	0,120

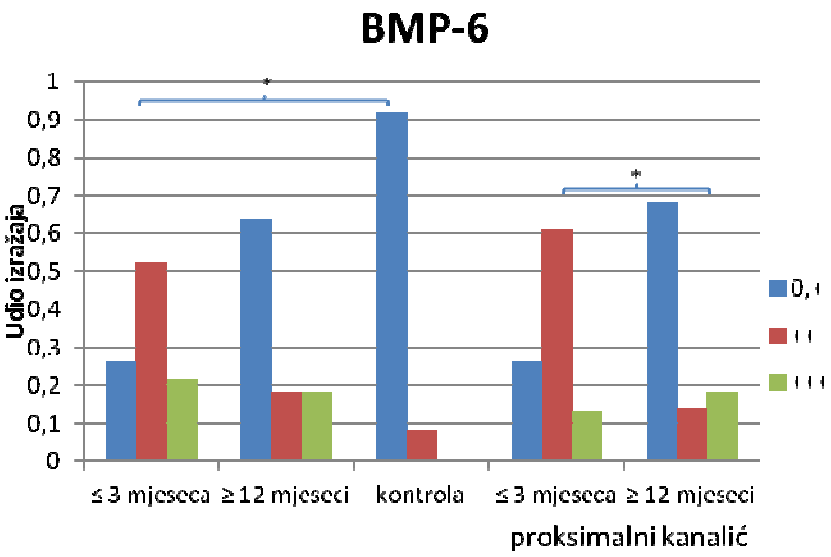
4.1.4. BMP-6

Izražaj BMP-6 u stanicama bubrega koji su kirurški uklonjeni u prva 3 mjeseca od transplantacije i nakon 12 mjeseci od transplantacije prikazan je na slici 16.



Slika 16. *A - izražaj BMP-6 u tkivu transplantiranog bubrega, vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja je iznosilo 72 dana, B - prikazuje izražaj BMP-6 u tkivu transplantiranog bubrega, vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja je iznosio 5,1 godina. Povećanje 20x.*

Iz slike 16 je vidljivo da je BMP-6 u uzorcima uklonjenim u prva 3 mjeseca od transplantacije bio pozitivan u citoplazmi proksimalnih, distalnih i kanalića srži, a stanice bubrežnih glomerula i Bowmanove čahure bile su negativne. U uzorcima tkiva bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci BMP-6 je bio značajno slabije izražen ili negativan u stanicam bubrežnih kanalića. U ovim uzorcima se Bowmanova čahura i glomeruli nisu obojali na BMP-6. Udio uzoraka sa jačim izražajem (++ i +++) BMP-6 u citoplazmi epitelnih stanica kanalića bio je statistički značajno veći u skupini bubrega uklonjenih u prva 3 mjeseca od transplantacije u odnosu na kontrolnu skupinu (tablica 18). Ova razlika se može opaziti na slici 17. Nije pronađena statistički značajna razlika u intenzitetu bojanja na BMP-6 između kontrolne skupine i uzoraka koji su bili transplantirani duže od 12 mjeseci. Analizom uzorka izražaja BMP-6 nije uočena razlika u jačini izražaja između proksimalnih, distalnih i kanalića srži unutar vremenskih skupina. No udio uzoraka sa jačim izražajem (++ i +++) BMP-6 u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića bio je statistički značajno veći u skupini bubrega uklonjenih u prva 3 mjeseca od transplantacije u odnosu na skupinu transplantiranu duže od 12 mjeseci (tablica 18), što je također prikazano na slici 17.



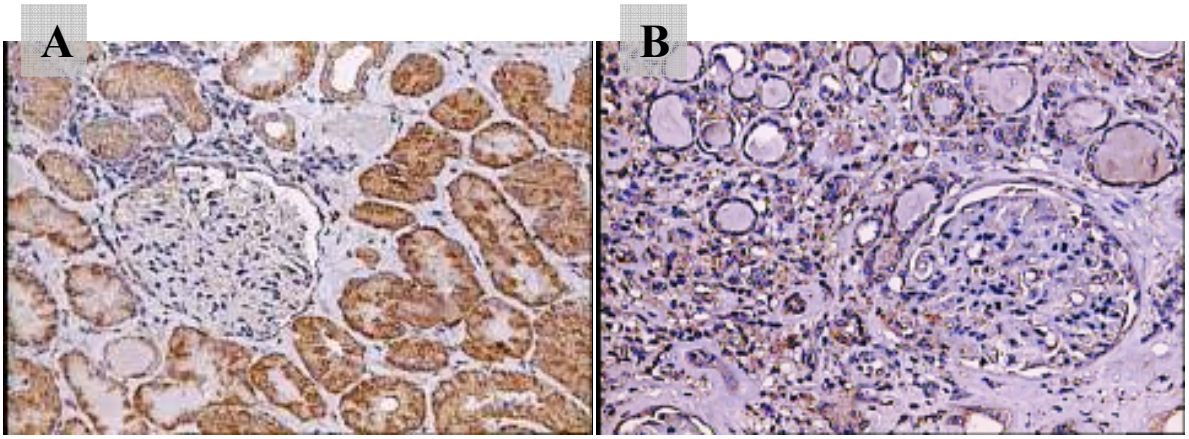
Slika 17. *Izražaj BMP-6 u uzorcima tkiva bubrega s obzirom na vremenski period koji je protekao od transplantacije do kirurškog uklanjanja. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP-6 0, +, ++ ili +++ ovisno o vremenskom periodu proteklom od transplantacije i u kontrolnoj skupni. Vremenski period je podijeljen na prva 3 mjeseca od transplantacije i na više od 12 mjeseci od transplantacije. Statistički značajna razlika između uzoraka je označena sa *.*

Tablica 18. *Tablica p vrijednosti za BMP-6.*

	p
≤ 3 mj. prema ≥ 12mj.	0.027
≤ 3 mj. prema kontrola	0.001
≥ 12mj. prema kontrola	0.310
Proksimalni kanalići ≤ 3 mj. prema ≥ 12mj.	0.003

4.1.5. BMP-7

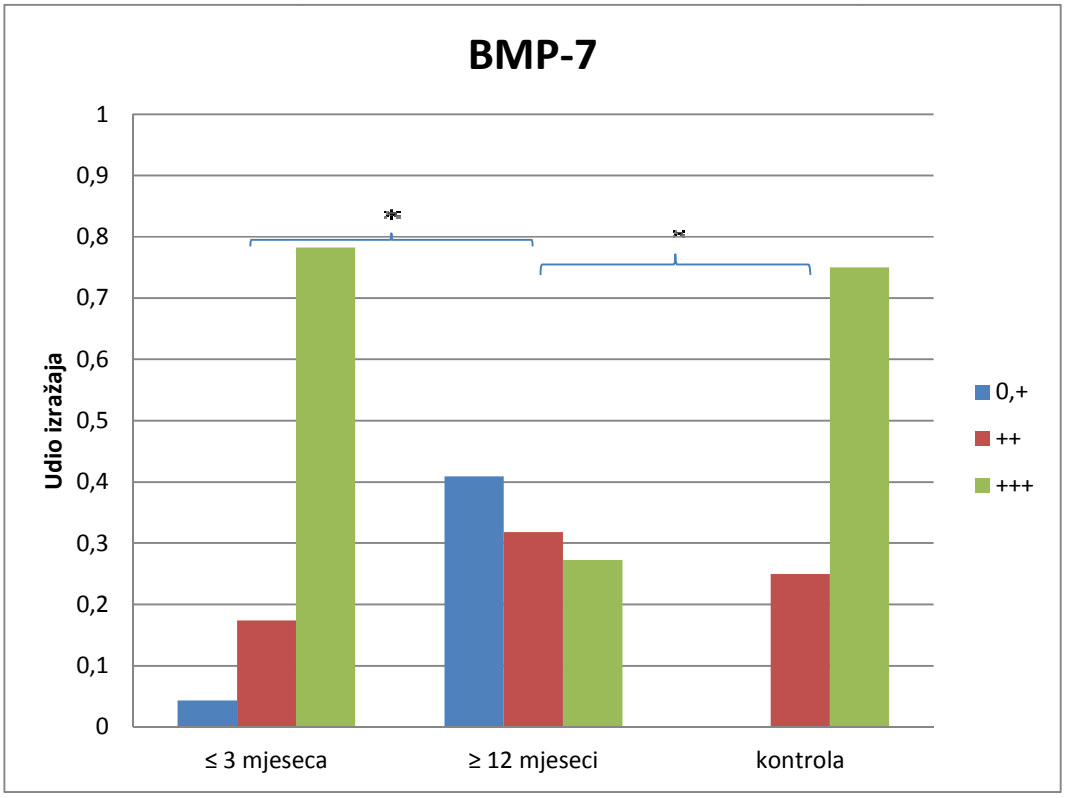
U uzorcima tkiva transplantiranih bubrega BMP-7 je vrlo jednolično i intenzivno izražen u citoplazmi stanica proksimalnih, distalnih i kanalića srži bubrega koji su kirurški uklonjeni u prva 3 mjeseca od transplantacije. U skupini uzoraka tkiva bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci od tranplantacije uočen je slabiji izražaj BMP-7 u stanicama bubrežnih kanalića. BMP-7 nije bio izražen u stanicama Bowmanove čahure ili glomerula bez obzira na duljinu trajanja presatka. Opisani izražaj BMP-7 je prikazan na slici 18.



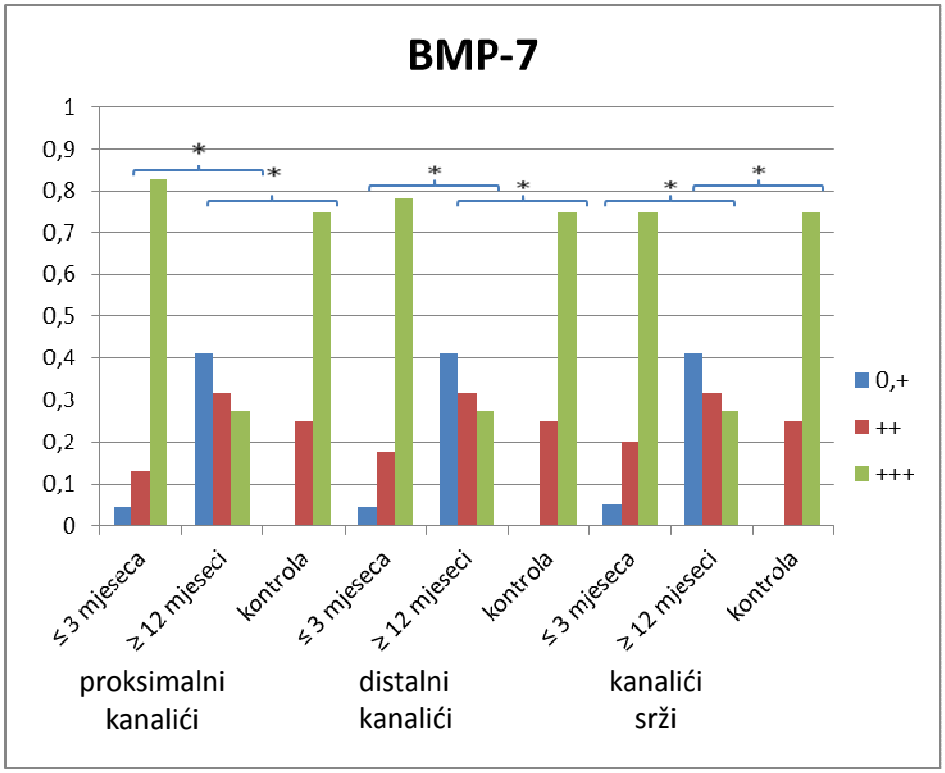
Slika 18. *A - izražaj BMP-7 u tkivu transplantiranog bubrega, vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja je iznosilo 72 dana, B - izražaj BMP-7 u tkivu transplantiranog bubrega, vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja iznosio je 5,1 godina. Povećanje 20x*

Udio uzoraka sa jačim izražajem (++ i +++) BMP-7 u citoplazmi epitelnih stanica bubrežnih kanalića bio je statistički značajno veći u skupini bubrega uklonjenih u prva 3 mjeseca od transplantacije u odnosu na skupinu bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci ($p= 0.001$). Ova razlika se može opaziti na slici 19. Udio uzoraka sa slabijim izražajem (0, +) bio je statistički značajno veći u skupni uklonjenoj nakon 12 mjeseci u odnosu na kontrolnu skupinu ($p= 0.009$). BMP-7 je podjednako izražen u epitelnim stanicama kanalića bubrega uklonjenih unutar 3 mjeseca od transplatnacije i u kontrolnoj skupini. Navedene razlike između ispitivanih skupina vidljive su na slici 19.

Nije uočena razlika u jakosti izražaja BMP-7 u proksilmalnih i distalnih, proksimalnih i kanalića srži te distalnih i kanalića srži obje skupine što je vidljivo je na slici 20.



Slika 19. *Izražaj BMP-7 u uzorcima tkiva bubrega s obzirom na vremenski period koji je protekao od transplantacije do kirurškog uklanjanja. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP-7 0, +, ++ ili +++ ovisno o vremenskom periodu proteklom od transplantacije i u kontrolnoj skupni. Vremenski period je podijeljen na prva 3 mjeseca od transplantacije i na više od 12 mjeseci od transplantacije. Statistički značajna razlika između uzoraka je označena sa *.*



Slika 20. *Izražaj BMP-7 u uzorcima tkiva bubrega s obzirom na vremenski period koji je protekao od transplantacije do kirurškog uklanjanja. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP-7 0, +, ++ ili +++ u proksimalnim, distalnim i kanalićima srži ovisno o vremenskom periodu proteklom od transplantacije i u kontrolnoj skupini. Vremenski period je podijeljen na prva 3 mjeseca od transplantacije i na više od 12 mjeseci od transplantacije. Statistički značajna razlika između uzoraka je označena sa *.*

Tablica 19. *Tablica p vrijednosti za BMP-7.*

	P		
	proksimalni kanalići	distalni kanalići	kanalići srži
≤ 3 mj. prema ≥ 12mj.	<0,001 (5,10E-04)	0,001	0,037
≤ 3 mj. prema kontrola	0,764	0,788	0,999
≥ 12mj. prema kontrola	0,009	0,009	0,009

4.2. Izražaj BMPa ovisno o kliničkoj dijagnozi koja je bila indikacija za kirurško uklanjanje

4.2.1. Tromboza arterije ili vene bubrega

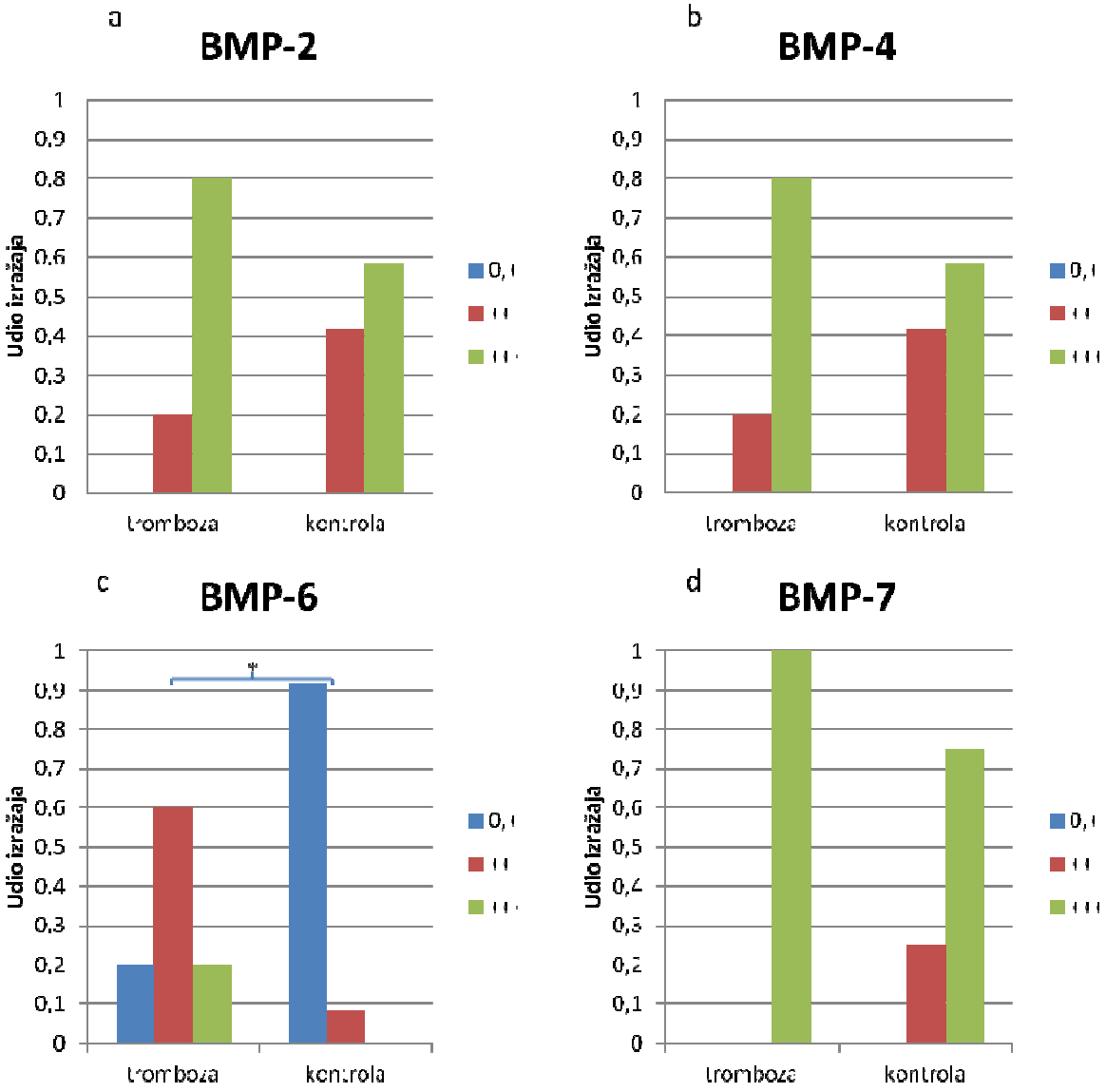
Tromboza bubrežne arterije ili vene bila je indikacija za kirurško uklanjanje 5 presadaka, prosječno vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja, iznosilo je 4,2± 1,7 dana. Na slici 21 prikazan je uzorak izražaja koštanih morfogenetskih proteina u uzorcima uklonjenim zbog infekcije i u kontrolnim uzorcima.

BMP-2 je bio pozitivan u epitelnim stanicama kanalića bubrega uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega. Izražaj je bio vrlo sličan izražaju u kontrolnoj skupini. BMP-2 je bio pozitivan u 20% uzoraka u Bowmanovoj čahuri. Iz grafa a slike 21 vidljivo je da nije postojala statistički značajna razlika u izražaju BMP-2 u uzoraka transplantiranih bubrega uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega i kontrolne skupine.

U uzorcima tkiva bubrega koji su kirurški uklonjeni zbog tromboze bubrežnih krvni žila uzorak izražaja BMP-4 bio je izuzetno nalik njegovom izražaju u kontrolnoj skupini. BMP-4 je bio pozitivan u stanicama proksimalnih kanalića, te slabije pozitivan u stanicama distalnih kanalića i kanalića srži. Iz grafa b slike 21 može se vidjeti da nije postojala statistički značajna razlika između izražaja u kontrolnoj i ispitivanoj skupini.

BMP-6 je bio pozitivan u epitelnim stanicama kanalića bubrega uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega. Iz grafa c slike 21 može se uočiti statistički značajno veći udio uzoraka izražaja ++ i +++ u skupini bubrega uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,010$).

BMP-7 je bio izražen u epitelnim stanicama kanalića transplantiranih bubrega uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega. Izražaj BMP-7 se nije razlikovao u ispitivanoj i kontrolnoj skupini što se može uočiti na grafu d slike 21.



Slika 21. *Izražaj BMP-a u uzorcima tkiva transplantiranih bubrega uklonjenih radi tromboze arterije ili vene transplantiranog bubrega i u kontrolnim uzorcima. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP 0, +, ++ ili +++ ovisno o indikaciji za kirurško uklanjanje; a) izražaj BMP-2, b) izražaj BMP-4, c) izražaj BMP-6, d) izražaj BMP-7. * označava statistički značajnu razliku između dviju skupina obavijenih vitičastom zagradom.*

4.2.2. Životno ugrožavajuća infekcija primatelja

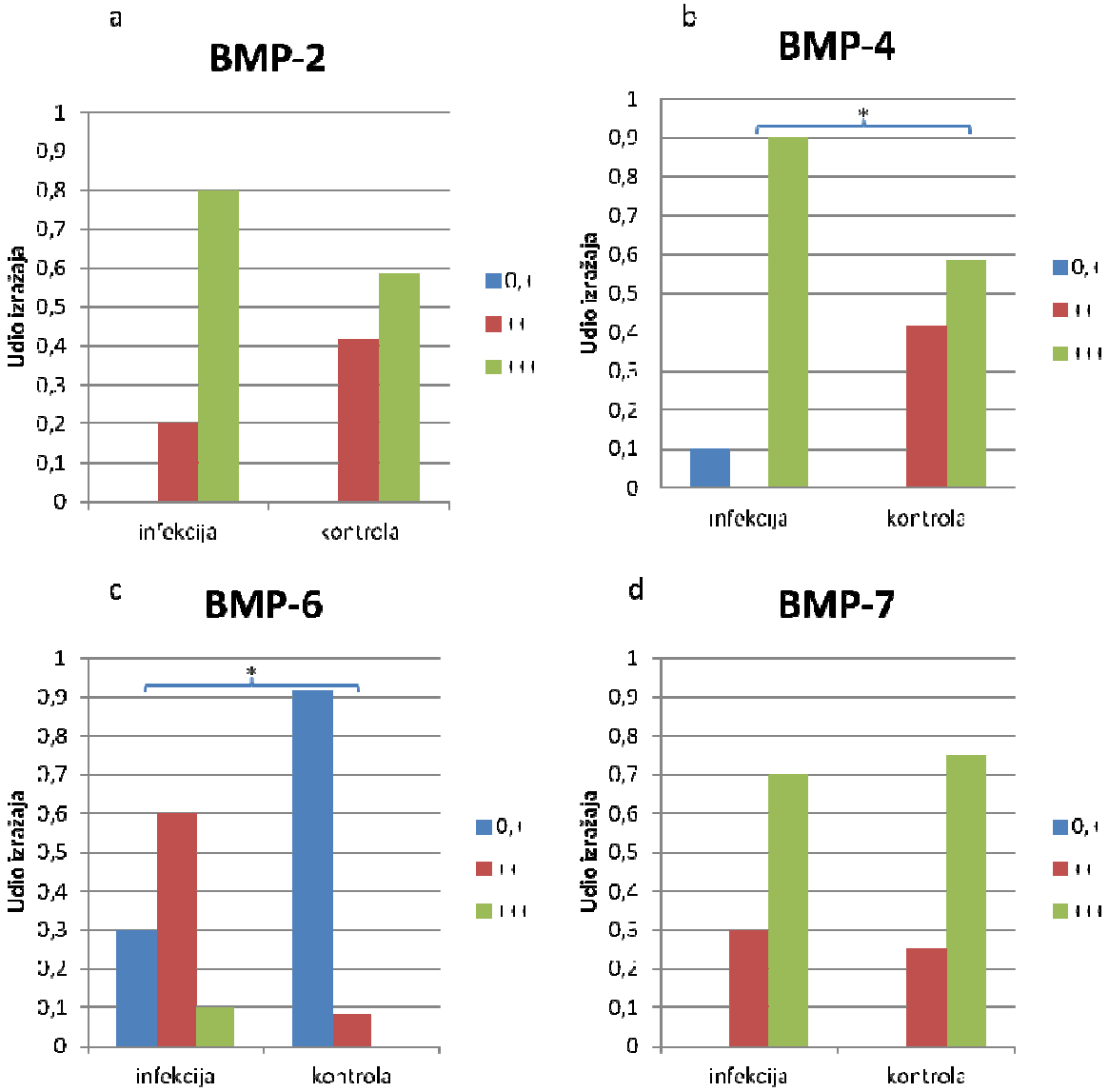
Deset presadaka je uklonjeno zbog životno ugrožavajuće infekcije primatelja koja je zahtijevala prekidanje imunosupresivnog liječenja i agresivno antimikrobno liječenje, u ovoj skupini je prosječno vrijeme trajanja presatka iznosilo je 71±23 dana.

BMP-2 je bio intenzivno izražen u stanicama epitela kanalića transplantiranih bubrega bolesnika sa infekcijom. U stanicama Bowmanove čahure bio je pozitivan u 80% uzoraka. Iz grafa a slike 22 može se uočiti da nije postojala razlika u izražaju BMP-2 u ispitivanoj skupini uzoraka bubrega uklonjenih zbog infekcije i u kontrolnoj skupini.

U kirurški uklonjenih uzoraka bubrega zbog životno ugrožavajuće infekcije primatelja BMP-4 je bio vrlo intenzivno izražen u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića i nešto slabije izražen u epitelnim stanicama distalnih i kanalića srži. Iz grafa b slike 22 može se uočiti da je udio uzoraka s izražajem +++ značajno veći u skupini uzoraka tkiva bubrega uklonjenoj zbog životno ugrožavajuće infekcije primatelja u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,040$).

BMP-6 je bio pozitivan u epitelnim stanicama kanalića bubrega uklonjenih zbog infekcije primatelja. Statistički je pokazano da je udio uzoraka izražaja ++ i +++ bio značajno veći u skupini uzoraka tkiva bubrega uklonjenih zbog infekcije primatelja u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,009$). Navedena razlika može se uočiti na slici 22 graf c.

BMP-7 je bio izražen u epitelnim stanicama kanalića transplantiranih bubrega uklonjenih zbog zbog infekcije primatelja. Izražaj BMP-7 se nije razlikovao u ispitivanoj i kontrolnoj skupini što se može uočiti na grafu d slike 22.



Slika 22. *Izražaj BMP-a u uzorcima tkiva transplantiranih bubrega uklonjenih radi životno ugrožavajuće infekcije primatelja i u kontrolnim uzorcima. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP 0, +, ++ ili +++ ovisno o indikaciji za kirurško uklanjanje; a) izražaj BMP-2, b) izražaj BMP-4, c) izražaj BMP-6, d) izražaj BMP-7. * označava statistički značajnu razliku između dviju skupina obavijenih vitičastom zagradom.*

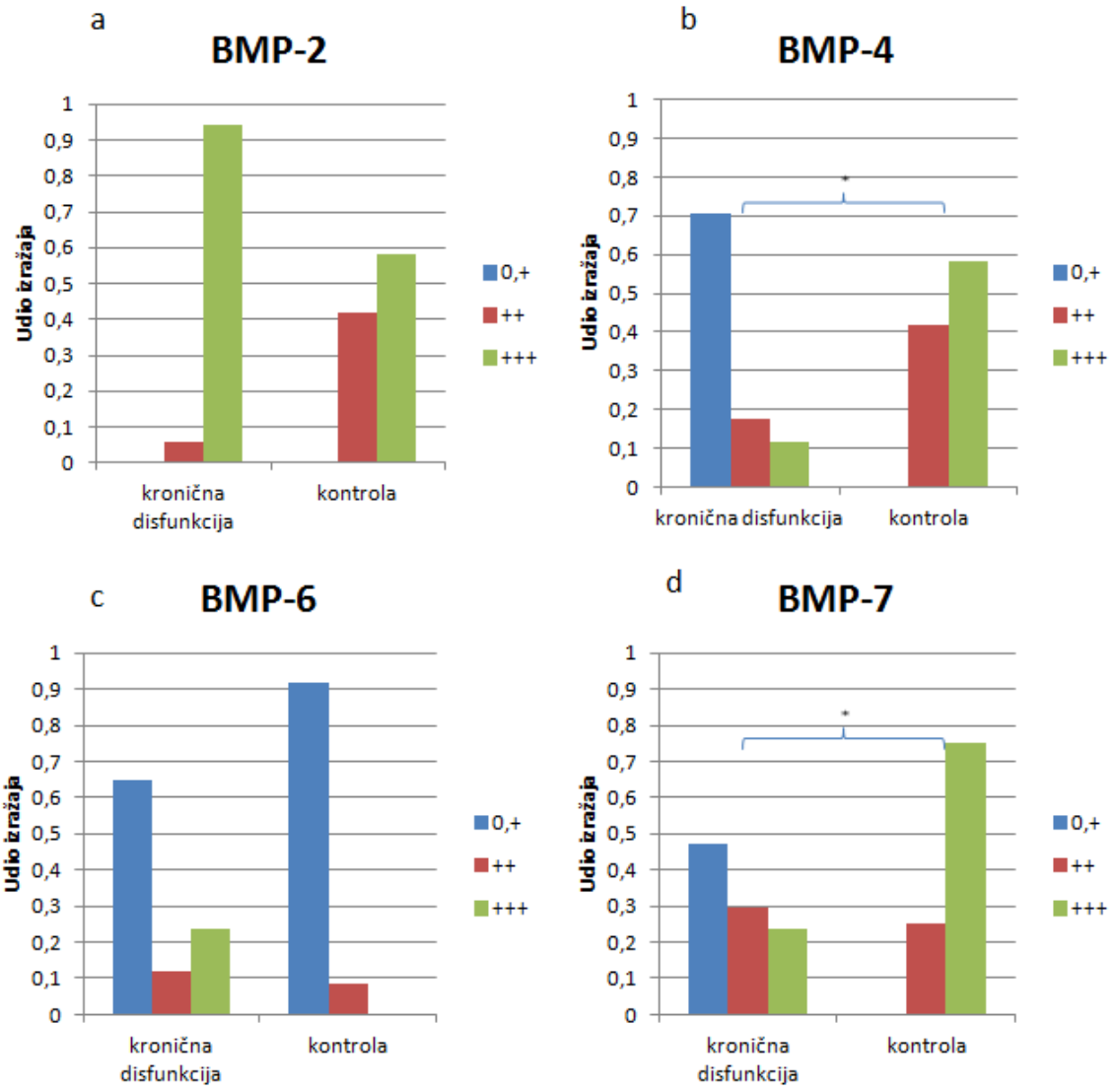
4.2.3. Kronična disfunkcija presatka

U 17 bolesnika indikacija za kirurško uklanjanje transplantiranog bubrega bila je kronična disfunkcija presatka zbog čega je započeto nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom. U ovoj skupini prosječno vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja presatka iznosilo je 8,3 ± 0,8 godina. U uzorcima presađenih bubrega koji su uklonjeni zbog kronične disfunkcije presatka BMP-2 je bio pozitivan u epitelnim stanicama kanalića bubrega te u 58,8 % uzoraka u epitelnim stanicama Bowmanove čahure. Izražaj BMP-2 se nije razlikovao u ispitivanoj i kontrolnoj skupini, što se može uočiti na grafu a slike 23.

BMP-4 je bio negativan u 70% uzoraka presadaka bubrega uklonjenih zbog njihove kronične disfunkcije. Iz grafa b slike 23 može se razabrati da je udio uzoraka sa izražajem 0 i + značajno veći u skupini uzoraka tkiva bubrega uklonjenoj zbog kronične disfunkcije u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,001(p= 0,0002)$).

BMP-6 je bio slabo izražen u uzorcima tkiva bubrega uklonjenih zbog kronične disfunkcije presatka. Iz grafa c slike 23 može se uočiti da nije postojala statistički značajna razlika u izražaju između ispitivane i kontrolne skupine.

U uzorcima presađenih bubrega koji su kirurški uklonjeni zbog njihove kronične disfunkcije BMP-7 je bio slabije izražen u odnosu na kontrolnu skupinu. Is grafa d slike 23 vidljivo je da je udio uzoraka sa izražajem BMP-7 0 i + statistički značajno veći u skupini sa kroničnom insuficijencijom u odnosu na kontrolnu skupinu ($p= 0,005$).



Slika 23. *Izražaj BMP-a u uzorcima tkiva transplantiranih bubrega uklonjenih radi kronične kronične disfunkcije presatka i u kontrolnim uzorcima. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP 0, +, ++ ili +++ ovisno o indikaciji za kirurško uklanjanje; a) izražaj BMP-2, b) izražaj BMP-4, c) izražaj BMP-6, d) izražaj BMP-7. * označava statistički značajnu razliku između dviju skupina obavijenih vitičastom zagradom.*

4.3. Analiza uzoraka prema izraženosti intersticijske fibroze i tubularne atrofije

Daljnjom analizom su izdvojeni uzroci sa patohistološkim znakovima intersticijske fibroze i tubularne atrofije (IFTA) prema klasifikaciji iz Banffa iz 2007.g, bez obzira na stupanj akutnog odbacivanja. Uzorci su podijeljeni u dvije skupine jedna je obuhvaćala uzorke bez znakova fibroze i tubularne atrofije i drugu koja je obuhvaćala uzorke sa intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom (IFTA) II i III stupnja prema klasifikaciji iz Banffa. U 22 uzorka patohistološkom analizom nije nađeno znakova fibroze, prosječno vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja za ove presatke je bilo 49 ± 14 dana. U 21 uzorku je opisana intersticijska fibroza i tubularna atrofija II i III stupnja prema klasifikacijia iz Banffa, ovi uzorci su prosječno bili transpantairani 6 ±1,2 godine.

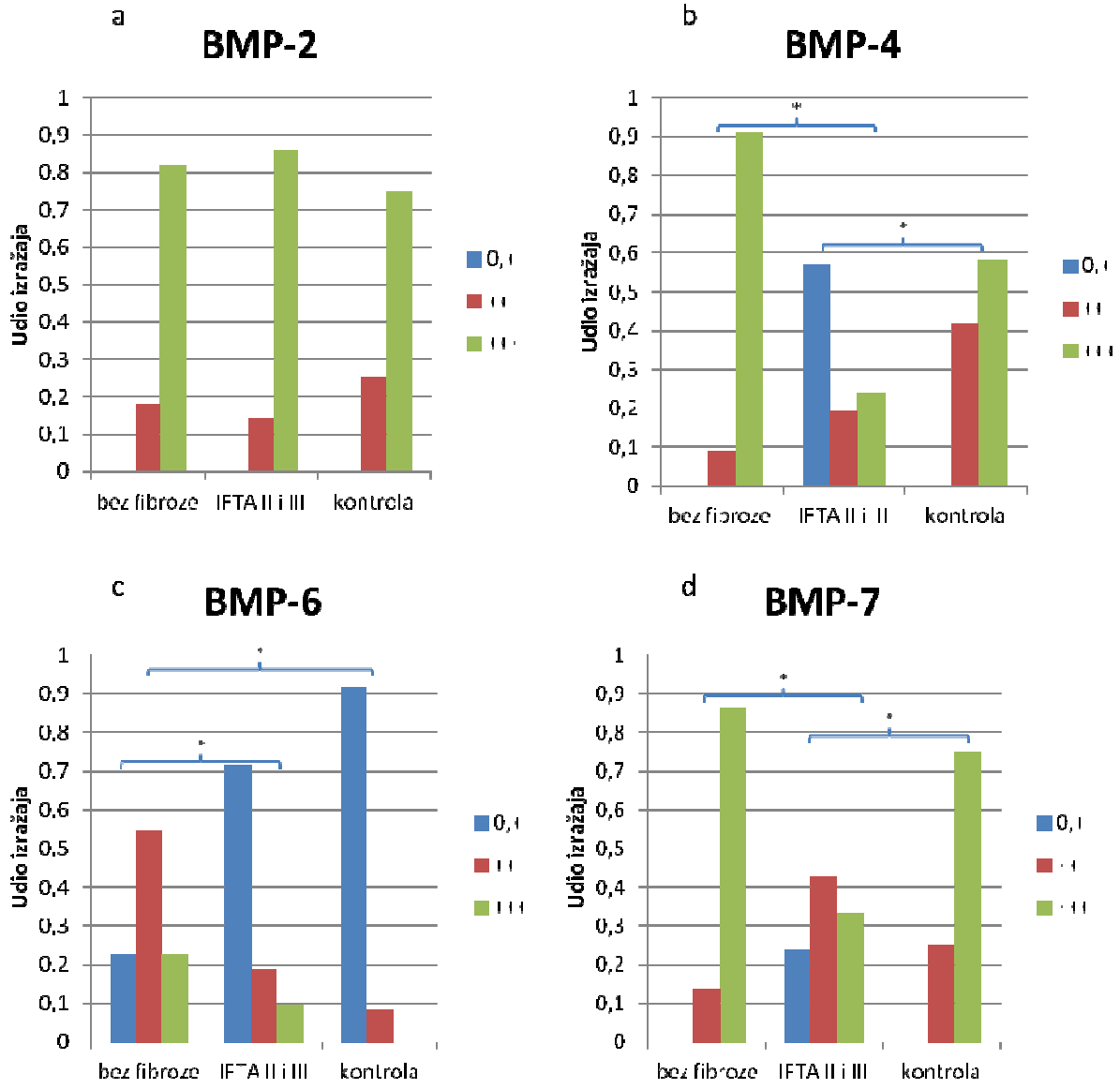
BMP-2 je većinom pozitivan u epitelnim stanicama bubrežnih kanalića kirurški uklonjenih presađenih bubrega bez obzira na stupanj intersticijske fibroze. Uočen je pozitivan izražaj u epitelnim stanicama Bowmanove čahure u 73 % uzoraka bez intersticijske fibroze i 65 % uzoraka sa IFTA II, III.

Iz grafa b slike 24 uočljiv je pozitivan izražaj BMP-4 u uzorcima bez znakova fibroze i slab izražaj BMP-4 u uzorcima sa IFTA II i III. U uzorcima presadaka bubrega bez znakova fibroze uočen je pozitivan BMP-4 u većini stanica proksimalnih kanalića i nešto slabiji izražaj u kanalićima srži. U uzorcima bubrežnih presadaka sa IFTA II i III izražaj BMP-4 je bio podjednako slabiji u epitelnim stanicama svih vrsta bubrežnih kanalića. Iz grafa b slike 24 uočava se da je udio uzoraka sa izražajem BMP-4 ++ i +++ bio statistički značajno veći u skupini bez znakova fibroze u odnosu na skupinu sa IFTA II i III. Nije postojala značajna razlika u izražaju u uzorcima bez fibroze i u kontrolnim uzorcima. Izražaj BMP-4 je bio značajno slabiji u uzorcima bubrežnih presadaka sa IFTA II i III u odnosu na izražaj u kontrolnoj skupni. Iz grafa b slike 24 se razabire da je udio uzoraka sa izražajem BMP-4 0 i + bio značajno veći u skupini uzoraka sa IFTA II i III u odnosu na kontrolnu skupinu (tablica 20).

Udio uzoraka bubrežnih presadaka u kojima je izražaj BMP-6 bio ++ i +++ u epitelnim stanicama kanalića bio je značajno veći u skupini bez znakova intersticijske fibroze u odnosu na skupinu sa IFTA II i III, što se može uočiti u grafu c slike 24, također se može uočiti i značajno

veći udio uzorka sa izražajem BMP-6 ++ i +++ u uzoraka bez fibroze i u kontrolnoj skupini (tablica 20).

Izražaj BMP-7 bio je pozitivan u epitelnim stanicama bubrežnih kanalića u svim uzorcima presadaka bez intersticijske fibroze i nalik izražaju u kontrolnoj skupini. Udio stanica sa izražajem BMP-7 ++ i +++ bio je statistički značajno veći u skupini uzoraka bez intersticijske fibroze u odnosu na skupinu presadaka sa IFTA II i III stupnja. Ova razlika se vidi na grafu d slike 24 i u tablici 20. U uzorcima sa intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom izražaj BMP-7 je vrlo slab. Udio uzoraka kirurški uklonjenih bubrega sa izražajem BMP-7 0 i + bio je značajno veći u skupini sa IFTA II i III stupnja u odnosu na kontrolnu skupinu (slika 24, tablica 20).



Slika 24. *Izražaj BMP-a u uzorcima tkiva transplantiranih bubrega uklonjenih bez intersticijske fibroze, sa intersticijskom fibrozom II i III stupnja (IFTA II i III) i kontrolnim uzorcima. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP 0, +, ++ ili +++ ovisno o stupnju fibroze uzorka; a) izražaj BMP-2, b) izražaj BMP-4, c) izražaj BMP-6, d) izražaj BMP-7. * označava statistički značajnu razliku između dviju skupina obavijenih vitičastom zagradom.*

Tablica 20. *p vrijednosti dobivene Fisherovim egzaktnim testom pri usporedbi udjela izražaja BMP-2, BMP-4, BMP-6 i BMP-7 intenziteta 0, +, ++, +++ u uzorcima bez fibroze (fibroza 0), sa intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom II i III stupnja (IFTA II, III) i kontrolnim uzorcima.*

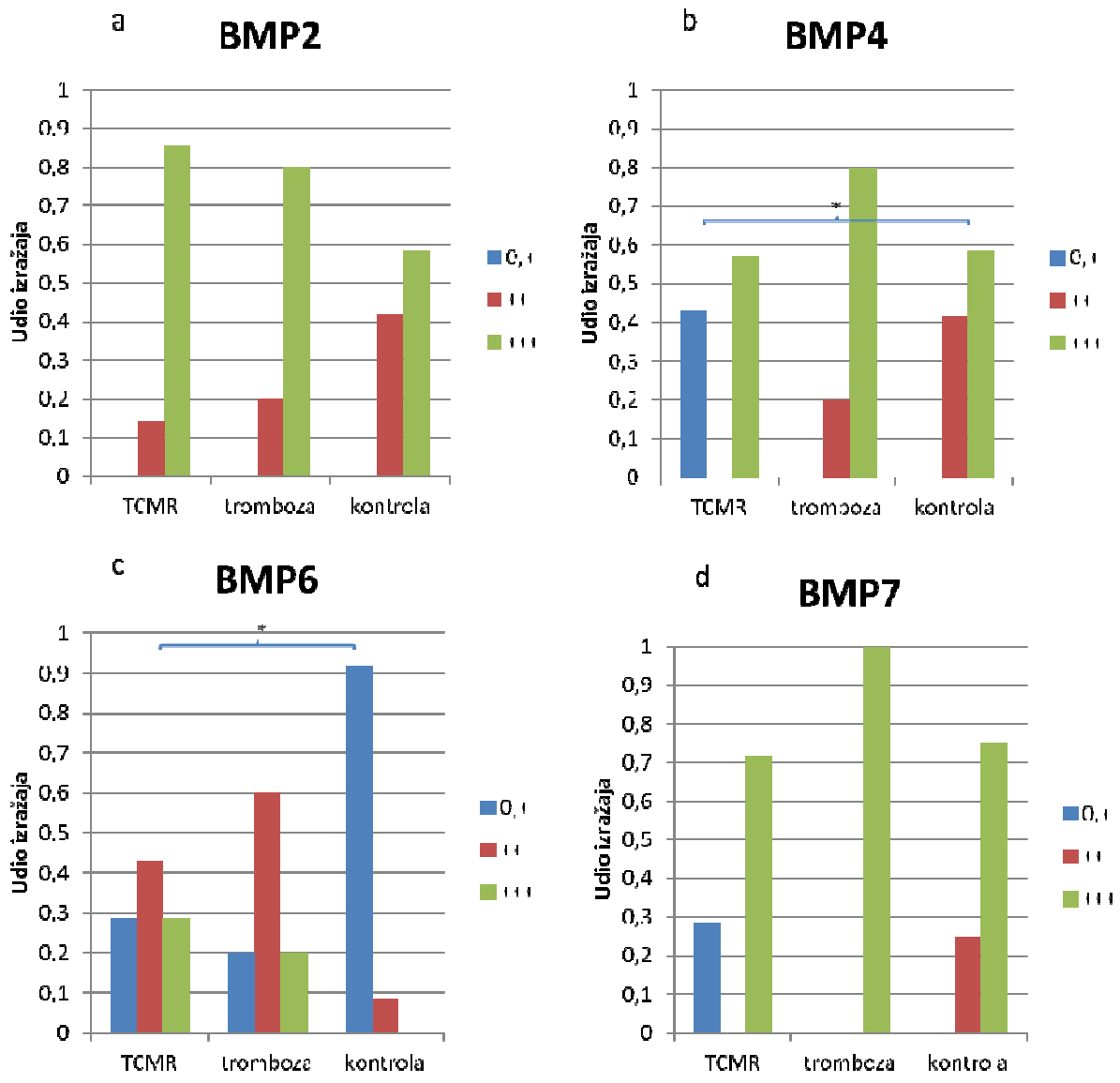
	p			
	BMP-2	BMP-4	BMP-6	BMP-7
fibroza 0 i kontrola	1	0,070	<0,001 (3,60E-04)	0,641
fibroza 0 i IFTA II,III	0,692	<0,001 (1,90E-06)	0,006	<0,001 (5,30E-04)
IFTA II, III i kontrola	0,653	0,003	0,524	0,044

Patohistološkom analizom je uočeno 7 uzoraka sa znakovima izoliranog akutnog T staničnog odbacivanja. U ovih uzoraka izražaj BMP-2 je bio pozitivan u citoplazmi epitelnih stanica bubrežnih kanalića i nije se razlikovao pri usporedbi sa uzorcima kontrolne skupine i uzorcima uklonjenim zbog tromboze arterije ili vene presatka (graf a, slika 25).

Uzorci sa akutnim T staničnim odbacivanjem imali su statistički značajno veći udio uzoraka sa izražajem BMP-4 0 i + u odnosu na kontrolnu skupinu (p= 0.020), no bez značajne razlike u odnosu na skupinu uklonjenu zbog tromboze arterije ili vene bubrega. U grafu b slike 25 prikazan je izražaj BMP-4 u navedenim uzorcima.

Udio uzoraka izražaja BMP-6 ++ i +++ u citoplazmi bubrežnih kanalica bio je statistički značajno veći u skupini uzoraka sa TCMR u odnosu na kontrolnu skupinu (p= 0.015) (graf c, slika 25). Nije uočena razlika u izražaju BMP-6 pri usporedbi uzoraka sa TCMR i uzoraka uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega.

BMP-7 je bio pozitivan u citoplazmi epitelnih stanica kanalića bubrežnog parenhima bubrega sa T staničnim odbacivanjem i nije se razlikovao u odnosu na izražaj BMP-7 u epitelnim satnicama kanalića u kontrolnoj skupini niti u odnosu na izražaj u skupini uklonjenoj zbog tromboze.



Slika 25. *Izražaj BMP-a u uzorcima tkiva transplantiranih bubrega sa akutnim T staničnim odbacivanje (TCMR), trombozom arterije ili vene bubrega i u kontrolnim uzorcima. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP 0, +, ++ ili +++ ovisno o TCMR ili trombozi krvnih žila presatka; a) izražaj BMP-2, b) izražaj BMP-4, c) izražaj BMP-6, d) izražaj BMP-7. * označava statistički značajnu razliku između dviju skupina obavijenih vitičastom zagradom.*

4.4. Specifičnost BMP-4

Prilikom analize uzorka izražaja BMP-4 uočen je njegov vrlo specifičan izražaj u pojedinoj vrsti epitela kanalića, a iz gore navedenih rezultata uočili smo da se izražaj BMP-4 razlikuje u više ispitivanih skupina. BMP-4 je bio negativan ili slabo pozitivan (+) u 16 uzoraka kirurški uklonjenih presadaka bubrega. U ovoj skupini je u 75% uzoraka indikacija za uklanjanje presatka bila kronična disfunkcija presatka. Prosječno vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja iznosilo je 8± 1,2 godine, a prosječna dob darivatelja je bila 41,7±4,2. U 27 uzoraka BMP-4 je imao izražaj +++, među ovim uzorcima kronična disfunkcija presatka bila je indikacija za kirurško uklanjanje 7,4% uzoraka, a prosječno vrijeme od transplantacije do kirurškog uklanjanja je bilo 1,2±0,7 godina. Prosječna dob darivatelja organa bila je 52,6±2,5 godine. U presadaka bubrega sa vrlo slabim izražajem BMP-4 kronična disfunkcija presatka je bila značajno češća indikacija za kirurško uklanjanje presatka u odnosu na presatka sa izražajem BMP-4 +++ ($p< 0,001$ ($p= 8,30E-06$). U uzoraka sa slabim izražajem BMP-4 prosječno trajanje presatka je bilo značajno duže od uzoraka sa izražajem BMP-4 +++ ($p<0,001$ ($p=5E-05$). Darivatelji bubrega bili su značajno mlađi u uzoraka koji su imali slabiji izražaj BMP-4 u odnosu na uzorke sa izražajem BMP-4 +++ ($p= 0,036$).

Također analizom izražaja BMP-4 uočen je specifičan uzorak bojanja citoplazme stanica bubrežnih kanalića, koji se može uočiti u tablici 16 i slici 13.

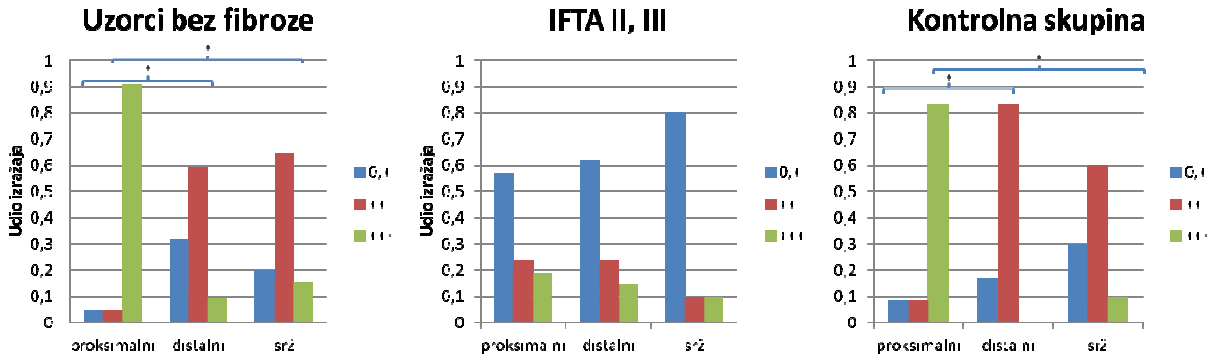
U normalnom tkivu bubrega najjači izražaj BMP-4 imale su stanice proksimalnih kanalića. Udio uzorka normalnog tkiva bubrega sa izražajem BMP-4 +++ u epitelnim stanicama proksimalnih kanalićima je bio statistički značajno veći od udjela uzoraka sa +++ u epitelnim stanicama distalnih kanalića ($p<0.001(3,40E-05)$) što se uočava na grafu c, slike 26. Također udio uzoraka izražaja BMP-4 +++ bio je značajno veći u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića u odnosu na epitelne stanice kanalića srži ($p= 0.002$) (graf c, slika 26). Nije nađena statistički značajna razlika u izražaju BMP-4 u epitalnim stanicama kanalića distalnih kanalića i srži u normalnom tkivu bubrega (graf c, slika 26).

Usporedbom izražaja BMP-4 u uzorcima ovisno o vremenu koje je proteklo od transplantacije do kirurškog uklanjanja, uočena je već ranije navedena statistički značajna razlika u izražaju BMP-4 u istovrsnim kanalićima u uspoređivanim uzorcima iz ova dva vremenska perioda.

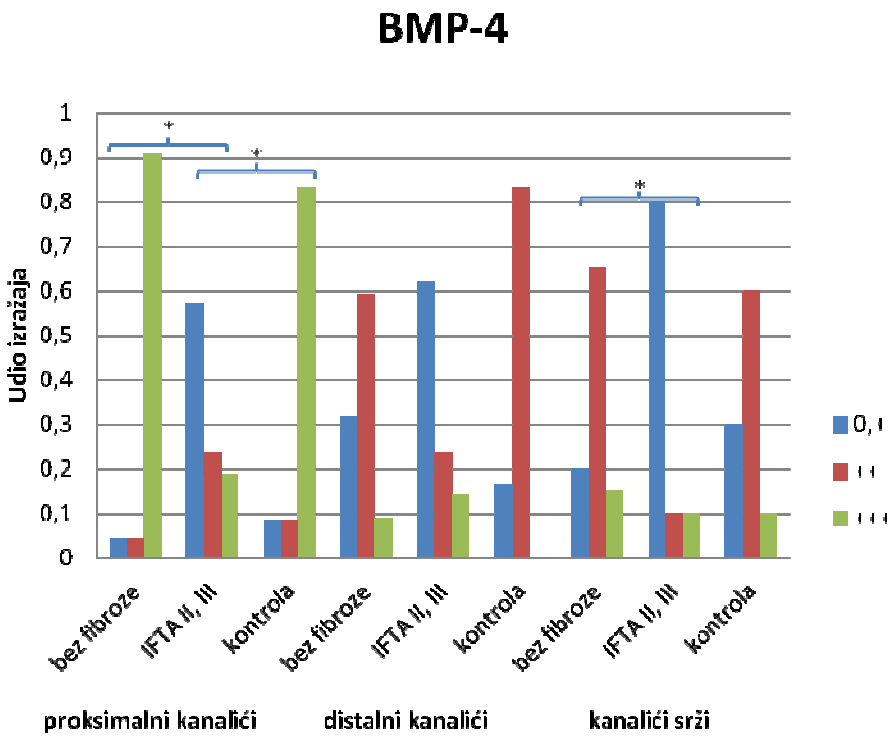
U uzorcima presadaka bubrega uklonjenih u prva 3 mjeseca od transplantacije udio uzoraka sa izražajem BMP-4 +++ u proksimalnim kanalićima bio je statistički značajno veći od udjela uzoraka sa izražajem BMP-4 +++ u distalnim kanalićima (p< 0,001; (p = 1,20E-06)) i kanalićima srži (p< 0,001 (p=7,20E-06), što se može uočiti na slici 15.
U uzoraka koji su transplantirani duže od 12 mjeseci uočen je statistički značajno veći udio uzoraka sa izražajem 0 i + u odnosu na uzorke iz skupine do 3 mjeseca, ali nestaje razlika u izražaju BMP-4 između proksimalnih i distalnih kanalića i proksimalnih i kanalića srži bubrega što se uočava na slici 15.

Analizom uzoraka prema stupnju intersticijske fibroze i tubularne atrofije, u uzorcima bez intersticijske fibroze i tubularne atrofije izražaj BMP-4 bio vrlo sličan izražaju u uzorcima kirurški uklonjenim u prva tri mjeseca od transplantacije i u kontrolnoj skupini. U uzorcima transplantiranih bubrega bez znakova fibroze intersticija BMP-4 je bio jako pozitivan u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića. U uzorku presadaka bez intersticijske fibroze udio uzoraka sa izražajem BMP-4 +++ u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića je bio statistički značajno veći od udjela uzoraka sa izražajem BMP-4 +++ u distalnim kanalićima (p < 0,001 (5,10E-08) i kanalićima srži (p < 0,001(9,80E-07)) što se uočava na grafu a slika 26. Također udio uzoraka bez intersticijske fibroze sa izražajem BMP-4 +++ u proksimalnim kanalićima bio je statistički značajno veću od udijela +++ u proksimalnim kanalićima uzoraka sa IFTA II i III (p<0,001(p=3,3E-06) (slika 27).

U uzorcima presadaka sa IFTA II i III BMP-4 je značajno slabije izražen. Statistički je značajno veći udio uzoraka sa IFTA II i III imao BMP-4 0 i 1 stanicama proksimalnih kanalića u odnosu na uzorke bez fibroze i kontrolnu skupinu (slika 26). Izražaj BMP-4 je bio statistički značajno jače izražen u stanicama kanalića srži u uzorcima bez fibroze u odnosu na izražaj u uzorcima sa IFTA II i III (p < 0,001 (p=1,30E-04)), slika 27. Razlika u jačini izražaja BMP-4 između proksimalnih i distalnih kanalićima, te proksimalnih i kanalićima srži u uzorcima sa IFTA II i III nije opažena (slika 26).



Slika 26. *Izražaj BMP-4 u proksimalnim, distalnim i kanalićima srži transplantiranih bubrega bez fibroze, s intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom II i III stupnja (IFTA II i III) i u kontrolnoj skupini. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP-4 0, +, ++ ili +++ ovisno o vrsti bubrežnih kanalića;* označava statistički značajnu razliku između dviju skupina obavijenih vitičastom zagradom.*



Slika 27. *Izražaj BMP-4 u proksimalnim, distalnim i kanalićima srži transplantiranih bubrega bez fibroze, s intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom II i III stupnja (IFTA II i III) i u kontrolnoj skupini. Izražaj je prikazan kao udio uzoraka koji su imali izražaj BMP-4 0, +, ++ ili +++ ovisno o stupnju fibroze i vrsti bubrežnih kanalića; * označava statistički značajnu razliku između dviju skupina obavijenih vitičastom zagradom.*

5. RASPRAVA

U ovom radu smo proučavali skupinu od 50 bolesnika sa kroničnim zatajenjem bubrežne funkcije kojima je zbog potrebe nadomještanja bubrežne funkcije učinjena transplantacija bubrega. Osobitost promatrane skupine bolesnika je bila činjenica da je zbog različitih kliničkih indikacija bilo potrebno kirurški ukloniti bubrežni presadak. Riječ je o bolesnicima kojima su bubrezi presađeni u razdoblju od 1988.g do kolovoza 2011.g, u 46 bolesnika u Klinici za urologiju, KBC Zagreb, u 3 bolesnika u transplantacijskom centru u Beču i u 1 bolesnika u KBC Rijeka. Od 50 kirurški uklonjenih bubrega njih 23 je transplantirano u razdoblju od kada je Hrvatska pristupila Eurotransplantu i započela s raspodjelom organa prema pravilniku Eurotransplanta u kolovozu 2007.godine. Ovo su ujedno i svi bolesnici kojima je uklonjen bubrežni presadak u našoj ustanovi u razdoblju od siječnja 2005.g do rujna 2011.g.
Najčešća indikacija za uklanjanje presatka bila je njegova kronična disfunkcija. Kronična disfunkcija presatka bila je indikacija za kirurško uklanjanje 34% svih presadaka. Ovi bubrezi su uklonjeni nakon prosječno 8,3 ± 0,8 godina od transplantacije. Prema podacima iz literature kronična disfunkcija presatka uzrokuje gubitak 50% presadaka u razdoblju nakon prve godine od transplantacije [55].

Druga najčešća indikacija je bila životno ugrožavajuća infekcija primatelja zbog koje je prekinuto imunosupresivno liječenje te je uzrokovala gubitka 10% presadaka. Unatoč sve boljim preventivnim metodama infekcije su još uvijek jedan od vodećih uzorka gubitka presatka bubrega. Prema podacima iz literature 80% svih bolesnika s presađenim bubregom prebole neku infekciju u prvoj godini nakon transplantacije [50]. Imunosupresivno liječenje je jedan od glavnih čimbenika rizika za razvoj infekcije, osobito razdoblju neposredno nakon transplantacije kada je i imunosupresija intenzivnija [48]. U proučavanoj skupini bolesnika njih 50% je primilo indukcijsku imunosupresiju daclizumabom (2 bolesnika) ili baziliksimabom (3 bolesnika), a u imunospuresivnom održavanju su primali trojnu terapiju koja se sastojala od inhibitora kalcineurina (takrolimus ili ciklosporin), mikofenolat mofetila i kortikosteroida.

Na trećem mjestu po broju kirurški uklonjenih bubrega bile su tromboza arterije ili vene presatka i bile su uzrok gubitka 10% presadaka ove populacije. Prosječno vrijeme od

transplantacije do uklanjanja presatka iznosilo je 4,2 ± 1,7 dana što je nešto duže od podataka iz literature gdje se navodi da je prosječno vrijeme nastanka tromboze 48 sati [25, 26]. Jedan bolesnik je liječen peritonealnom dijalizom za koju se u literaturi navodi da povećava rizik od tromboze arterije ili vene bubrega [33, 34]. Prema podacima iz literature tromboza arterije ili vene bubrega uzrokuje gubitak 2-7% bubrežnih presadaka u ranom razdoblju.

Prosječna dob bolesnika u trenutku transplantacije iznosila je 39,9 ± 2,2 godine, dok je medijan dobi transplantiranih bolesnika u sustavu Eurotransplanta u posljednje 3 godine 55 godina [22], no 1990.g medijan je bio 46 godina.

Najčešća osnovna bubrežna bolest u promatranoj skupini bio je kronični glomerulonefritis bez učinjene biopsije bubrega u 22%, što je u kliničkoj praksi skupni naziv za bolest bubrega ne sasvim jasnog porijekla, a u trenutku otkrivanja je kronično zatajenje bubrega toliko uznapredovalo da biopsija bubrega ne bi doprinijela niti dijagnozi osnovne bolesti niti modalitetu liječenja. Vezikouretrali refluks je bio uzrok kroničnog zatajenja bubrežne funkcije u 5% bolesnika, a po 4% su uzrokovali fokalna segmentalna glomeruloskleroza, policistična bolest bubrega i lupus nefropatija. U promatranih bolesnika transplantacija bubrega je bila druga metoda liječenja kroničnog bubrežnog zatajenja, naime u svih bolesnika inicijalno po nastupu zatajenja bubrežne funkcije započeto je liječenje dijalizom. Hemodijaliza je bila prva metoda nadomještanja bubrežne funkcije u 86% bolesnika, dok je 14% bolesnika bilo liječeno peritonealna dijaliza. Liječenje dijalizom do transplantacije bubrega je trajalo prosječno 5,7 ± 0,7 godina, prema podacima iz Eurotranplanta, medijan vremena provedenog na dijalizi do transplantacije u posljednjih 11 godina bio je oko 50 mjeseci [22].

Bubrežni presadci su u 96% bolesnika bili od preminulog davatelja s kucajućim srcem, što je u skladu sa prosjekom R Hrvatske, u kojoj je 2011.g 92,3% bolesnika dobilo presadak od preminulog darivatelja, a 7,7% od živog srodnog ili nesrodnog darivatelja. Prosječna dob darivatelja bubrega iznosila je 48 ± 2,4 godine. Stupanj HLA nepodudarnosti je iznosio u prosjeku 2,6 ± 0,1. U 2011.g prosječna nepodudarnost u R Hrvatskoj iznosila je 3,06 ± 0,1.
U protokolu imunosupresivnog liječenja 38,6% bolesnika je primalo indukcijsku imunosupresivnu terapiju. Indukcijska imunosupresivna terapija se sastojala od mišjih monoklonskih protutijela na alfa lanac IL2 receptora T limfocita, antitimocitnih globulina ili antilimfocitnih monoklonskih protutijela. Ovako relativno malen udio bolesnika koji su primili

indukcijsku imunosupresivnu terapiju treba promatrati u skladu sa razdobljem kada je učinjena transplantacija, dakle u većine bolesnika prije KDIGO smjernica o skrbi bolesnika sa presađenim bubregom, koje su objavljene 2009.g. Ove smjernice preporučuju započinjanje liječenja indukcijskom imunosupresivnom terapijom prije ili u trenutku transplantacije. Antagonisti IL-2 receptora T limfocita su imunosupresiv izbora osim u bolesnika sa visokim imunološkim rizikom u kojih se preporučuje primjena antitimocitnih globulina [18].

U terapiji održavanja 98% bolesnika je primalo trojnu imunosupresivnu terapiju, a samo jedan bolesnik je primao dvojnu terapiju ciklosporinom i kortikosteroidima. Trojna imunosupresivna terapija se sastojala inhibitora kalcijneurina (ciklosporin ili takrolimus), antiproliferativnog lijeka (mikofenolat mofetila ili azatioprina) i kortikosteroida. U 89,1% bolesnika imunosupresivno liječenje je započeto ciklosporinom, kortikosteroidima te je 78 % ovih bolesnika je liječeno mikofenolat mofetilom. U ostalih je bolesnika liječenje započeto azatioprinom, ali je on u kasnijem stadiju u 44% bolesnika zamijenjen mikofenolat mofetilom. U 6 bolesnika ciklosporin je zamijenjen takrolimusom. Dvoje bolesnika je liječeno takrolimusom, mikofenolat mofetilom i kortikosteroidima, a u jednog bolesnika takrolimus je zamijenjen sirolimusom. Imunosupresivno liječenje pri kojem je ciklosporin glavni kalcineurinski inhibitor je također odraz razdoblja u kojem su ove transplantacije učinjene. Indikacija za promjenu imunosupresiva uglavnom je bilo pogoršanje bubrežne funkcije usprkos liječenja ataka akutnog odbacivanja bolusima kortikosteroida. Prema KDIGO preporukama iz 2009.g takrolimus je kalcijneurinski inhibitor izbora, a antiproliferativni lijek prvog izbora je mikofenolat mofetil [18,96, 97].

Akutna odbacivanja bubrežnih presadaka klinički su uočena kao pogoršanje bubrežne funkcije u smislu porasta kreatinina i ureje u serumu, pojave značajne proteinurije ili njezino pogoršanje ili vrlo sigurni znakovi poput febriliteta uz bolnosti presatka. U većine bolesnika je učinjena biopsija presatka, te su na temelju nalaza biopsije bolesnici liječeni bolusima kortikosteroida. Bolusima kortikosteroida liječena su akutna T stanična odbacivanja te granične promjene prema klasifikaciji iz Banffa. U starijoj kliničkoj praksi nisu za svako pogoršanje bubrežne funkcije bolesnika učinjene i biopsije bubrega koje bi i razjasnilo njezin uzrok već su bolesnici liječeni bolusima kortikosteroida i empirijski. U promatranoj skupini 38% bolesnika je liječeno bolusima kortikosteroida zbog kliničkih znakova pogoršanja bubrežne funkcije. Oni su

imali u prosjeku 2,3±0,3 klinički uočena pogoršanja bubrežne funkcije liječena bolusima kortikosteroida.

Analizom podataka o vremenskom periodu koji je protekao od transplantacije bubrega do njegovog kirurškog uklanjanja ustanovljeno je da je u prva tri posttransplantacijska mjeseca kirurški uklonjeno 44,9% presadaka, a u razdoblju nakon prve godine njih 42,9%, u 26,5% bolesnika imalo je bubrežni presadak duže od 5 godina. U pet bolesnika je bubreg uklonjen u razdoblju između 3 mjeseca i kraće od 12 mjeseci, u 2 bolesnika indikacija je bila povrat osnovne bolesti, u 2 bolesnika životno ugrožavajuća infekcija primatelja te u jednog bolesnika hematurija za koju se kasnije utvrdilo da se radi o Fabryevoj bolesti u presađenom bubregu. Sukladno s dosadašnjim spoznajama najčešće indikacije za kirurško uklanjanje su se grupirale prema vremenskom periodu koji je protekao od transplantacije do operativnog uklanjanja. Indikacije za rano uklanjanje presatka bile su infekcija primatelja koja zahtijeva prekidanje imunosupresivnog liječenja, tromboza bubrežne vene ili arterije i kirurške komplikacije. Najčešća indikacija za kasno uklanjanje presatka bila je kronična disfunkcija presatka, što je u skladu s podacima u literaturi [23].

Dosadašnja istraživanja pokazuju da su koštani morfogenetski proteini važni za pravilan rast i razvoj bubrega. Osobito je dobro istražen izražaj BMP-2, BMP-4 i BMP-7 u embrionalnom razvoju mišjih bubrega.

Na eksperimentalnom modelu miševa prikazana je uloga BMP-2 u embrionalnom razvoju bubrega, gdje se pretpostavlja da je njihova uloga u inhibiranju granajuće morfogeneze na vršcima ureteričnog pupoljka [127]. Istraživanja kultura fibroblasta bubrega transformiranih kako bi stvarale BMP-2 pokazale su značajnu supresiju učinka TGFβ1 i sinteze fibronektina u stanicama bubrežnih fibroblasta [145]. U literaturi ne postoje podaci o izražaju BMP-2 u zdravom tkivu ljudskih bubrega niti u ljudskim presadcima bubrega. U jednom slučaju karcinoma bubrega sa opsežnom zonom osifikacije, u citoplazmi tumorskih stanica pronađen je snažan izražaj BMP-2, autori su bili mišljenja da je do osifikacije došlo uslijed metaplazije pluripotnentnih matičnih stanica u osteoblaste uslijed parakrine sekrecije BMP-2 iz okolnih tumorskih stanica [140]. U zdravom tkivu bubrega BMP-2 je bio izrazito pozitivan u citoplazmi epitelnih stanica kanalića bubrega i u citoplazmi epitelnih stanica Bowmanove membrane. Nije uočena razlika u jačini izražaja između pojedinih vrsta epitelnih stanica kanalića zdravog tkiva

bubrega. BMP-2 je bio izrazito pozitivan u citoplazmi epitelnih stanica kanalića i kore i srži bez obzira na duljinu perioda koji je protekao od transplantacije do kirurškog uklanjanja. Također nije uočena razlika u izražaju s obzirom na klinički indikaciju za kirurško uklanjanja niti stupanj intersticijske fibroze i tubularne atrofije. U Bowmanovoj membrani BMP-2 je bio izražen u najmanjem broju uzoraka uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega, njih 20%, dok je u uzoraka uklonjenih zbog životno ugrožavajuće infekcije primatelja bio pozitivan u Bowmanovoj membrani 80% uzoraka presađenih bubrega. Izražaj BMP-2 u Bowmanovoj čahuri se nije razlikovao u uzorcima različitog stupnja intersticijske fibroze i tubularne atrofije i bio je pozitivan 60 do 75% uzoraka.

BMP-4 ima važnu ulogu u razvoju bubrega. BMP-4 je izražen u metanefritičkom mezenhimu duž Wolffove cijevi prije početka razvoja bubrega, mezenhimu koji okružuje ureterični pupoljak prije invazije i mezenhimskim stanicama ureteričnog držka nakon indukcije [127]. Heterozigotni miševi za BMP-4 imaju čitav niz abnormalnosti bubrega i urinarnog sustava. Čini se da BMP-4 ima ulogu u ograničavanju mjesta i broja stvorenih ureteričnih pupoljaka [127]. Brenner-Anantharam i sur. su otkrili ključnu ulogu BMP-4 u morfogenezi uretera, u određivanju usmjerenja razvoja u ureter ili u sabirne cijevi tijekom organogeneze [129]. U svjetlu ovih spoznaja Tabatabaeifa i sur. objavili su istraživanje u kojem su prikazali 3 „missens“ mutacije gena BMP-4 u petero djece sa anomalijama bubrega i urinarnog trakta, koje su uključivale agenezu bubrega, hipoplaziju, displaziju ili dvostruke bubrege i malformacije uretera [146].

U našim uzorcima, BMP-4 je u zdravom tkivu bubrega bio najjače izražen u proksimalnim kanalićima, a značajno slabije u distalnim kanalićima i kanalićima srži. Nije uočen izražaj BMP-4 u stanicama glomerula niti epiltelu Bowmanove čahure.
U uzorcima tkiva bubrega uklonjenih u prva tri mjeseca od transplantacije, u uzoraka uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega i u uzorcima bez znakova intersticijske fibroze i tubularne atrofije izražaj BMP-4 slijedio je obrazac izražaja u zdravom tkivu bubrega. To znači da je u ovim uzorcima tkiva transplantiranih bubrega najjači izražaj bio u proksimalnim kanalićima, a statistički značajno slabiji u distalnim kanalićima u odnosu na proksimalne kanaliće i statistički značajno sabije izražen u kanalićima srži u odnosu na proksimalne kanaliće.

U uzorcima transplantiranih bubrega uklonjenih zbog životno ugrožavajuće infekcije BMP-4 je bio statistički značajno jače izražen u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima u odnosu na kontrolnu skupinu.

BMP-4 je bio značajno slabije izražen u uzorcima transplantiranih bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci, u uzorcima uklonjenim zbog kronične disfunkcije presatka i u uzorcima s intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom stadija II i III. Riječ je o uzorcima tkiva bubrega u kojih se teže mogu raspoznati pojedine vrste epitelnih stanica kanalića, te se sa gubitkom morfologije epitelnih stanica izgubila i razlika u izražaju BMP-4 u pojedinim vrstama epitelnih stanica.

Analizom uzoraka prema izražaju BMP-4 u 16 uzoraka tkiva transplantirano bubrega BMP-4 bio negativan ili slabo pozitivan, a u 27 uzoraka transplantiranih bubrega je izražaj BMP-4 bio izrazito pozitivan (+++). U uzorcima tkiva transplantiranih bubrega koji su imali negativan ili slabo pozitivan izražaj BMP-4 kronična insuficijencija presatka ja bila značajno češća indikacija za kirurško uklanjanje u odnosu na presatke sa jakim izražajem, ujedno ovi presadci su vremenski bili značajno duže transplantirani (u prosjeku 8±1,2 godine) od bubrega sa jakim izražaje, te su darivatelji ovih presadaka bili značajno mlađi u odnosu na presatke koji su uklonjeni u prva tri mjeseca od transplantacije. Ovi rezultati se uklapaju u dosadašnje spoznaje da je kronična disfunkcija presatka jedan od glavnih uzroka gubitka presatka nakon prve godine od transplantacije i da presadci mlađih darivatelja imaju duže preživljenje [23, 24].
U uzorcima transplantiranih bubrega izražaj BMP-4 se značajno razlikovao i između epitelnih stanica pojedine vrste kanalića.

Usporedbom izražaja BMP-4 u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića uzoraka tkiva bubrega uklonjenih u prva tri mjeseca od transplantacije u odnosu na izražaj u proksimalnim kanalićima uzoraka tkiva uklonjenim nakon 12 mjeseci postoji jasan značajno veći broj uzoraka uklonjenih u prva tri mjeseca od transplantacije sa jačim izražajem BMP-4 u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića. Izražaj BMP-4 je slabiji u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića u značajno većem broju uzoraka transplantiranih bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci u odnosu na izražaj BMP-4 u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića kontrolne skupine.
Izražaj BMP-4 u distalnim kanalićima uzoraka transplantiranih bubrega uklonjenih u prva 3 mjeseca od transplantacije je slabiji u odnosu na izražaj u proksimalnim kanalićima istih uzoraka,

ali je izražaj BMP-4 još uvijek statistički značajno jači u epitelu distalnih kanalića uzoraka uklonjenih u prva tri mjeseca od transplantacije u odnosu na izražaj BMP-4 u epitelnim stanicama distalnih kanalića uzoraka transplantiranih bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci od transplantacije. BMP-4 je slabije izražen u epitelu distalnih kanalića u statistički većeg broja uzoraka uklonjenih nakon 12 mjeseci od transplantacije u odnosu na izražaj u distalnim kanalićima kontrolne skupine. Slična razlika postoji i u izražaju u stanicama kanalića srži. BMP-4 je slabije izražen u kanalićima srži uzoraka transplantiranih bubrega uklonjenih u prva tri mjeseca od transplantacije, u donosu na izražaj u proksimalnim kanalićima istih uzoraka, ali je izražaj BMP-4 još uvijek jači u epitelu kanalića srži u statički značajno većem broju uzoraka transplantiranih bubrega uklonjenih u prva tri mjeseca u odnosu na izražaj BMP-4 u epitelnim stanicama kanalića srži transplantiranih bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci. Epitelne stanice kanalića srži tkiva bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci imale su značajno slabiji izražaj BMP-4 od epitelnih stanica kanalića srži kontrolne skupine.

Iz literature je poznato da se prvi znakovi aktivnosti procesa koji dovode do kronične disfunkcije presatka pokazuju upravo u razdoblju nakon trećeg mjeseca od transplantacije [147]. Ovi procesi dovode do fibroze intersticija bubrega i atrofije kanalića, što se u kronično insuficijentnih bubrega patohistološkom analizom očituje kao intersticijska fibroza i atrofija tubula različitog (najčešće III) stupnja prema klasifikaciji iz Banffa. Iz navedenih rezultata je jasna razlika u izražaju BMP-4 s obzirom na vrijeme koje je proteklo od transplantacije do kirurškog uklanjanja, zbog čega je analiziran izražaj BMP-4 i prema stupnju intersicijske fibroze i tubularne atrofije u uzorcima transplantiranih bubrega. U uzorcima bez intersticijske fibroze i tubularne atrofije izražaj BMP-4 je vrlo sličan izražaju u uzorcima kirurški uklonjenih bubrega u prva tri mjeseca od transplatnacije i u kontrolnoj skupini. U uzorcima presadaka bubrega bez znakova intersticijske fibroze i tubularne atrofije BMP-4 je pozitivan u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića i statistički je značajno jače izražen nego u epitelu distalnih kanalića i kanalića srži. Usporedbom izražaja BMP-4 u uzorcima bez intersticijske fibroze i sa uozcima sa IFTA II i III, izražaj BMP-4 je jače izražen u proksimalnim kanalićima uzoraka bez intersticijske fibroze u odnosu na izražaju u epitelu proksimalnih kanalića uzorka sa IFTA II i III. Također je izražaj BMP-4 u epitelnim stanicama kanalića srži uzoraka bez fibroze značajno jače izražen u odnosu na izražaj u kanalićima srži uzoraka sa IFTA II i III. U uzorcima presadaka bubrega sa nalazom IFTA II i III BMP-4 je značajno slabije izražen u epitelu svih vrsta kanalića te se više ne

uočava razlika u izražaju BMP-4 u epitelu pojedine vrste kanalića. Iz čega se može naslutiti da je BMP-4 jedan od proteina koji održava morfologiju epitela bubrežnih kanalića, a u uzoraka sa IFTA u kojih je morfologija kanalića izrazito promijenjena, BMP-4 je slabije izražen. Kada su izolirani uzorci sa samo T staničnim odbacivanjem, uočen je statistički značajno slabiji izražaj BMP-4 u epitelu kanalića bubrega u odnosu na izražaj u kontrolnoj skupini. Navedeni podaci mogu upućivati na modulaciju izražaja BMP-4 čimbenicima upale.

Istraživanjem funkcije BMP-6 na miševima kojima on nedostaje, nije uočena bilo kakva morfološka ili funkcionalna promjena njihovih bubrega [127]. U ljudskim bubrezima u normalnom bubrežnom tkivu pokazana je snažna izraženost BMP-6 mRNA [139]. Pokazana je i jača izraženost BMP-6 u svjetlostaničnom tipu karcinoma bubrega, ali izražaj nije korelirao sa preživljenjem i kliničkopatološkim obilježjima ispitanika [139]. U našim uzorcima u normalnom tkivu bubrega BMP-6 nije detekiran u stanicama glomerula niti Bowmanove čahure, a vrlo slab izražaj je uočen u epitelnim stanicama proksimalnih, distalnih i kanalića srži. U tkivu bubrega uklonjenih u prva tri posttransplantacijska mjeseca BMP-6 je bio statistički značajno jače izražen u kanalićima bubrežnog parenhima u odnosu na izražaj u kanalićima parenhima normalnih bubrega. Nije uočena razlika u izražaju BMP-6 u uzorcima tkiva bubrega uklonjenom u prva 3 posttransplantacijska mjeseca i u uzoraka uklonjenih nakon 12 mjeseci. Također nije uočena niti razlika u izražaju BMP-6 u uzoraka uklonjenih nakon 12 mjeseci i kontrolne skupine. BMP-6 je bio statistički značajno jače izražen u kanalićima bubrežnog parenhima uzoraka uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene presatka u odnosu na kontrolne uzorke i BMP-6 je bio statistički jače izražen u epitelu kanalića bubrežnog parenhima uzoraka uklonjenih zbog životno ugrožavajuće infekcije u odnosu na kontrolu skupinu. Analizom uzoraka s obzirom na stupnju intersticijske fibroze i tubularne BMP-6 je statistički jače izražen u uzrocima bez znakova fibroze i tubularne atrofije u odnosu na uzorke sa IFTA II i III, ali je i izražaj BMP-6 u uzorcima bez intersticijske fibroze i tubularne atrofije jači u odnosu na kontrolnu skupinu. Izražaj BMP-6 je bio i statistički jači u epitelu kanalića bubrega uzoraka sa T staničnim odbacivanjem u odnosu na kontrolnu skupinu. Jači izražaj BMP-6 u uzoraka uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega, u odnosu na kontrolnu skupinu, kao i njegov jači izražaj u prva tri posttransplantacijska mjeseca, kao i u uzorcima bez intersticijske fibroze i tubularne atrofije mogao bi upućivati na aktivaciju izražaja BMP-6 nekim od čimbenika koji su vezani za samo transplantaciju kao što je vrijeme hladne ishemije. Na modelu ishemijsko- reperfuzijske ozljede mozga štakora pokazan je pojačan

izražaj BMP-6 u tkivu mozga nakon ishemije i potom reperfuzije tkiva. Pokazano je da BMP-6 in vitro ima učinak na smanjenje oštećenja nastalog ishemijom. [148]. Također na izražaj BMP-6 mogli bi djelovati i čimbenici upale jer je BMP-6 bio statistički značajno jače izražen i u uzoraka sa T staničnim odbacivanjem i u uzoraka sa akutnim infektom primatelja u kojeg je ukinuto imunosupresivno liječenje.

BMP-7 je jedini od koštanih morfogenetskih proteina za koji je dokazano da je ključn u razvoju bubrega, jer homozigotni miševi s null mutacijom za BMP-7 umiru u slici uremije nakon okota [127]. Uloga i izražaj BMP-7 u bubrezima je dosada najviše istražena. Tako je njegov izražaj uočen u odraslih štakora duž čitavog nefrona i to u području vanjske srži, umjerena u kanalićima unutarnje srži, slabije u glomerulima dok je jedva prisutna u korteksu. Snažna izraženost je prisutna u adventiciji bubrežnih arterija i u epitelnim stanicama pijelona i uretera [82]. U normalnom bubrežnom tkivu u literaturi je prikazan izražaj u 6 ljudskih bubrega gdje je mRNA za BMP-7 najjače izražena u distalnom dijelu nefrona (distalni kanalić i sabirne cijevi), u glomerulima je jedva uočljiva, a u proksimalnim kanalićima se nije uspjelo dokazati izraženost BMP-7 mRNA niti proteina [134]. Analiza izražaja BMP-7 i njegovih receptora u normalnom tkivu bubrega i u karcinomu svijetlih stanica u 64 uzorka ukazala na izražaj BMP-7 i njegovih receptora i pSmad1/5/8 u svim strukturama bubrežnog parenhima normalnog tkiva bubrega, a osobito jaku izraženost u epitelu proksimalnih kanalića bubrežnog parenhima [149]. U našim uzorcima u zdravom tkivu bubrega BMP-7 je bio jako izražen u citoplazmi epitelnih stanica proksimalnih, distalnih i kanalić srži. BMP-7 nije uočen u epitelnim stanicama Bowmanove čahure niti u stanicama glomerula. Izražaj BMP-7 u tkivu transplantiranih bubrega uklonjenih u prva 3 posttransplantacijska mjeseca bio je vrlo sličan izražaju BMP-7 u normalnom tkivu bubrega. BMP-7 u transplantiranom tkivu bubrega koji su uklonjeni u prva tri posttransplantacijska mjeseca je vrlo jak u epitelnim stanicama kanalića bubrega. Izražaj BMP-7 u uzorcima transplantiranih bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci je značajno slabiji u kanalićima bubrežnog parenhima u odnosu na izražaj u BMP-7 u kontrolnoj skupini. Također BMP-7 je značajno slabije izražen epitelu kanalića transplantiranih bubrega uklonjenih nakon 12 mjeseci od transplantacije u odnosu na njegov izražaj u kanalićima bubrežnog parenhima uzoraka uklonjenih nakon 3 mjeseca. Nije uočena razlika u izražaju BMP-7 u uzoraka presadaka bubrega uklonjenih zbog tromboze arterije ili vene bubrega i uzoraka uklonjenih zbog životno ugrožavajuće infekcije primatelja u odnosu na izražaj BMP-7 u kontrolnoj skupini. Izražaj BMP-7 je bio statistički

značajno slabije izražen u kanalićima bubrežnog parenhima uzoraka transplantiranih bubrega uklonjenih zbog kronične disfunkcije presatka u odnosu na izražaj u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima kontrolne skupine. To odgovara dosadašnjim spoznajama gdje je smanjen izražaj BMP-7 pokazan u uzorcima dobivenim biopsijom bubrega bolesnika s dijabetičkom nefropatijom [150, 151]. Također je nađen i potisnut izražaj BMP-7 mRNA u tumorima svijetlih stanica bubrega [152], što ukazuje na zaštitnu ulogu BMP-7 u održavanju strukture i funkcije odraslih bubrega. U uzorcima biopsija transplantiranih bubrega u vrijeme akutnog odbacivanja, pokazano maleno smanjenje unutarstanične signalizacije potaknute BMP-7, dok je ono značajno smanjeno u uzorcima sa kroničnim odbacivanje i jasnom intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofiju [81]. U našim uzorcima transplantiranih bubrega u kojih je patohistološkom analizom nađeno samo akutno T stanično odbacivanje, nije postojala razlika u izražaju BMP-7 u ispitivanoj i kontrolnoj skupini. U uzoraka tkiva sa nalazom intersticijske fibroze i tubularne atrofije II i III stupnja BMP-7 je bio značajno slabije izražen u odnosu na uzorke bez znakova intersticijske fibroze i u odnosu na izražaj BMP-7 u kontrolnoj skupini.

6. ZAKLJUČAK

Iz prikazanih istraživanja zaključili smo slijedeće:

1. Najčešće indikacije za kirurško uklanjanje presatka bubrega u prva tri mjeseca nakon transplantacije bile su infekcije primatelja zbog kojih je ukinuta imunosupresivna terapija, tromboza arterije ili vene bubrega i kirurške komplikacije. U razdoblju nakon 12 mjeseci najčešća indikacija za kirurško uklanjanje bila je kronična disfunkcija presatka.
2. U tkivu transplantiranih bubrega uklonjenih u prva tri posttransplantacijska mjeseca izražaj BMP-6 u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima je statistički značajno jači u odnosu na izražaj BMP-6 u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima kontrolne skupine.
3. U tkivu bubrega transplantiranom duže od 12 mjeseci postoji statistički značajno slabiji izražaj BMP-4 i BMP-7 u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima u odnosu na izražaj u normalnom tkivu bubrega.
4. U uzorcima tkiva transplantiranih bubrega koji su kirurški uklonjeni zbog tromboze velikih krvnih žila presatka BMP-6 je bio statistički značajno jače izražen u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima u odnosu na kontrolnu skupinu. Izražaj BMP-2, BMP-4, BMP-7 se nije razlikovao u uzrocima transplantiranog tkiva bubrega i kontrolnoj skupni.
5. U uzrocima tkiva transplantiranih bubrega uklonjenih zbog životno ugrožavajuće infekcije koja je zahtijevala ukidanje imunosupresije BMP-4 i BMP-6 su bili statistički značajno jače izraženi u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima u odnosu na kontrolnu skupinu.
6. Koštani morfogenetski proteini 4 i 7 su statistički značajno slabije izraženi u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima tkiva presadaka bubrega uklonjenih zbog kronične disfunkcije presatka u odnosu na kontrolnu skupinu.
7. Izražaj BMP-4, BMP-6 i BMP-7 statistički je značajno jače izražen u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima tkiva transplantiranih bubrega bez znakova fibroze intersticija i tubularne atrofije u odnosu na uzorke transplantiranih bubrega sa znakovima fibroze intersticija i tubularne atrofije II i III stupnja.

8. BMP-4 i BMP-7 statistički su značajno slabije izraženi u epitelnim stanicama kanalića tkiva bubrega sa intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom II i III stupnja u odnosu na zdravo tkivo bubrega.
9. BMP-4 i BMP-6 su statistički značajno jače izraženi u epitelnim stanicama bubrežnih kanalića uzoraka s T staničnim odbacivanjem u odnosu na kontrolnu skupinu.
10. BMP-4 je statistički značajno jače izražen u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića u odnosu na distalne i kanaliće srži u uzorcima zdravog tkiva bubrega i u tkivu presađenih bubrega uklonjenih u prva 3 mjeseca od transplantacije te u uzorcima presadaka bez znakova intersticijske fibroze i tubularne atrofije. U uzorcima presadaka bubrega s intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom BMP-4 je jednolično statistički značajno slabije izražen u odnosu na uzorke bez intersticijske fibroze i tubularne atrofije. Gubitkom morfoloških karakteristika kanalića gubi se i razlika u izraženosti BMP-4 između pojedinih vrsta kanalića.

U konačnici možemo sažeti da jačina i uzorak izražaja koštanih morfogenetskih proteina u tkivu presađenog bubrega ovisi o dužini trajanja presatka u primatelju bubrega, o kliničkoj indikaciji za kirurško uklanjanje presatka i o postojanju intersticijske fibroze i tubularne atrofije u tkivu presatka.

7. SAŽETAK

UVOD: U Republici Hrvatskoj oko 450000 osoba boluje od kronične bolesti bubrega ili ima povećani rizik za njezin razvoj. Transplantacija bubrega je metoda izbora u liječenju završnog stadija kroničnog zatajenja bubrega. Razvojem i usavršavanjem imunosupresivne terapije smanjen je broj epizoda akutnih odbacivanja presadaka, ali prosječno preživljenje presatka stagnira posljednjih 20 godina. Potraga za čimbenicima koji su uključeni u proces oštećenja i gubitka funkcije presatka jedan je od motiva istraživanja u ovoj disertaciji.

CILJ ISTRAŽIVANJA: Cilj doktorskog rada bio je ispitati povezanost uzorka izražaja koštanih morfogenetskih proteina(BMP) i uzroka poremećaja funkcije presatka i posljedičnog kirurškog odstranjenja. Ovim istraživanjem željeli smo pokazati da postoji razlika uzorka izražaja koštanih morfogenetskih proteina u tkivu kirurški uklonjenog presatka i zdravom tkivu bubrega te da je ta razlika u izražaju povezana s uzrokom poremećaja funkcije presatka koji je bio indikacija za njegovo kirurško uklanjanje.

ISPITANICI I METODE: Istraženo je tkivo 50 bubrežnih presadaka koji su kirurški uklonjeni iz bolesnika zbog različitih indikacija nakon transplantacije. Imunohistokemijskom metodom prikazan je izražaj proteina BMP-2, BMP-4. BMP-6 i BMP-7 u tkivu transplantiranih bubrega i u normalnom tkivu bubrega kontrolne skupine. Kontrolnu skupinu činili su uzorci normalnog tkiva bubrega, dobiveni nefrektomijom bolesnika s lokaliziranim tumorom bubrega. Za analizu je korišteno tkivo uzeto s najudaljenijeg mjesta od sijela tumora. Razlika u izražaju koštanih morfogenetskih proteina utvrđena je korištenjem Fisherovog testa.

REZULTATI: Ovim istraživanjem je pokazano da su najčešće indikacije za kirurško uklanjanje presatka bubrega u prva tri mjeseca nakon transplantacije bile su infekcije primatelja zbog kojih je ukinuta imunosupresivna terapija, tromboza arterije ili vene bubrega i kirurške komplikacije. U razdoblju nakon 12 mjeseci najčešća indikacija za kirurško uklanjanje bila je kronična disfunkcija presatka. U tkivu transplantiranih bubrega uklonjenih u prva tri posttransplantacijska mjeseca izražaj BMP-6 u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima je statistički značajno jači u odnosu na izražaj BMP-6 u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima kontrolne skupine. U tkivu bubrega transplantiranom duže od 12 mjeseci postoji statistički značajno slabiji izražaj BMP-4 i BMP-7 u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima u odnosu na izražaj

u normalnom tkivu bubrega. U uzorcima tkiva transplantiranih bubrega koji su kirurški uklonjeni zbog tromboze velikih krvnih žila presatka BMP-6 je bio statistički značajno jače izražen u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima u odnosu na kontrolnu skupinu. Izražaj BMP-2, BMP-4, BMP-7 se nije razlikovao u uzrocima transplantiranog tkiva bubrega i kontrolnoj skupni. U uzrocima tkiva transplantiranih bubrega uklonjenih zbog životno ugrožavajuće infekcije koja je zahtijevala ukidanje imunosupresije BMP-4 i BMP-6 su bili statistički značajno jače izraženi u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima u odnosu na kontrolnu skupinu. Koštani morfogenetski proteini 4 i 7 su statistički značajno slabije izraženi u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima tkiva presadaka bubrega uklonjenih zbog kronične insuficijencije presatka u odnosu na kontrolnu skupinu. Izražaj BMP-4, BMP-6 i BMP-7 statistički je značajno jače izražen u epitelnim stanicama kanalića bubrežnog parenhima tkiva transplantiranih bubrega bez znakova fibroze intersticija i tubularne atrofije u odnosu na uzorke transplantiranih bubrega sa znakovima fibroze intersticija i tubularne atrofije II i III stupnja. BMP-4 i BMP-7 statistički su značajno slabije izraženi u epitelnim stanicama kanalića tkiva bubrega sa intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom II i III stupnja u odnosu na zdravo tkivo bubrega. BMP-4 i BMP-6 su statistički značajno jače izraženi u epitelnim stanicama bubrežnih kanalića uzoraka s T staničnim odbacivanjem u odnosu na kontrolnu skupinu. BMP-4 je statistički značajno jače izražen u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića u odnosu na distalne i kanaliće srži u uzorcima zdravog tkiva bubrega i u tkivu presađenih bubrega uklonjenih u prva 3 mjeseca od transplantacije te u uzorcima presadaka bez znakova intersticijske fibroze i tubularne atrofije. U uzorcima presadaka bubrega s intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom BMP-4 je jednolično statistički značajno slabije izražen u odnosu na uzorke bez intersticijske fibroze i tubularne atrofije. Gubitkom morfoloških karakteristika kanalića gubi se i razlika u izraženosti BMP-4 između pojedinih vrsta kanalića.

ZAKLJUČAK: Jačina i uzorak izražaja koštanih morfogenetskih proteina u tkivu presađenog bubrega ovisi o vremenskom periodu koliko je presadak bio u primatelju bubrega, o kliničkoj indikaciji za kirurško uklanjanje presatka i o postojanju intersticijske fibroze i tubularne atrofije u tkivu presatka.

KLJUČNE RIJEČI: Koštani morfogenetski protein, transplantacija bubrega, kirurško uklanjanje presatka bubrega, kronična disfunkcija presatka.

8. SUMMARY

INTRODUCTION: In Republic of Croatia around 450000 people has an increased risk or manifest chronic kidney disease. Kidney transplantation is method of choice in managing end stage kidney disease. Improvement in immunosuppressive therapy lowered the number of acute allograft rejection episodes, but long-term allograft function remains unchanged over the past 20 years. Finding key players involved in the process of chronic graft disfunction was one of the driving forces of this Thesis

AIM: The aim of this Thesis was to investigate the connection between expression pattern of bone morphogenetic proteins in kidney allograft tissue and the cause of allograft dysfunction and the subsequent need for transplant nephrectomy. By performing this study our aim was to show a difference in bone morphogenetic protein expression pattern in normal and allograft kidney tissue, and that this difference is connected to the cause of allograft dysfunction that was the clinical indication for transplant nephrectomy.

METHODS: A total of 50 kidney allografts were analyzed. They were obtained by transplant nephrectomy due to different clinical indication. Expression pattern of BMP-2, BMP-4. BMP-6 and BMP-7 in normal and allograft kidney tissue was shown by immunohistochemical staining. Normal kidney tissue was obtained from kidneys with localized kidney tumor that were surgically removed. Tissue that was taken from the most distant point from the tumor was analyzed. The difference in bone morphogenetic protein expression was calculated by Fisher exact test.

RESULTS: In this study it has been shown that the most common indications for transplant nephrectomy in the first three months after transplantation were host infection that demanded reduction of immunosuppression, renal artery or vein thrombosis and surgical complications. In the second period after 12 months after transplantation, chronic allograft dysfunction was the most common indication for transplant nephrectomy. In kidney transplant tissue that was removed during the first 3 months BMP-6 expression was higher in comparison to BMP-6 expression in normal kidney tissue. In transplanted kidney tissue that was removed more than 12 months after transplantation BMP-4 and BMP-7 expression in tubular epithelial cells was significantly lower than in normal kidney tissue. In transplanted kidney tissue that was removed due to thrombosis of renal artery or vein BMP-6 expression was significantly higher in tubular

epithelial cells than in normal kidney tissue. The expression of BMP-2, BMP-4 and BMP-7 did not differ between transplanted and normal kidney tissue in this group. In transplanted kidney tissue that was removed due to life threatening infection that demanded cessation of immunosuppressive therapy BMP-4 and BMP-6 expression was significantly higher in tubular epithelial cells than in normal kidney tissue. BMP-4 and BMP-7 expression was statistically lower in tubular epithelial cell of kidney transplants that were removed due to chronic allograft dysfunction in comparison to normal kidney tissue. Comparison of transplanted kidney tissue without signs of interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) with kidney tissue that displayed grade II and III of IFTA showed that BMP-4, BMP-6 and BMP-7 had statistically higher expression in tissue without IFTA. BMP-4 and BMP-7 had significantly lower expression in epithelial tubular cells of transplanted kidney tissue with IFTA II and IFTA III in comparison with normal kidney tissue. BMP-4 and BMP-6 had significantly higher expression in epithelial tubular cells in transplanted kidney tissue with acute T cell mediated rejection in comparison with normal kidney tissue. BMP-4 had significantly stronger expression in proximal tubular epithelial cells in comparison with distal and medullar epithelial cells in normal kidney tissue, in transplanted kidney tissue that was removed within first 3 months after transplantation, and in transplanted kidney tissue without IFTA. In kidney transplant specimens with IFTA II and III BMP-4 had uniform significantly lower expression in comparison with specimens without fibrosis. Loss of morphological characteristics of tubular epithelial cells brings a loss of BMP-4 expression diversity among different tubular epithelial cells.

CONCLUSION: Intensity and expression pattern of bone morphogenetic proteins in transplanted kidney tissue is dependent upon the length of the transplanted period, clinical indication for transplant nephrectomy and signs of interstitial fibrosis and tubular atrophy in kidney tissue.

KEY WORDS: Bone morphogenetic protein, renal transplantation, transplant nephrectomy, chronic allograft dysfunction.

9. LITERATURA

1. Krmpotić-Nemanić J. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 1993, str. 829.
2. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. Prijevod 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008, str. 231-240.
3. Grbeša Đ. Stručni poslijediplomski studij iz perinaltologije, knjiga predavanja. Razvitak i anomalije bubrega. Zagreb; 1998, str. 49-55.
4. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Osnove histologije 7 izd. Zagreb: Školska knjiga; 1999, str 373-95.
5. Guyton, JE Hall. Medicinska fiziologija.11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2006, str 291-418.
6. Šoša T, Sutlić Ž, Stanec Z i sur. Kirurgija. Zagreb: Naklada Ljevak, 2007. Str. 173-192.
7. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison´s principles of internal Medicine-17th edition. McGrawHill; 2008, str. 1748-1750.
8. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y i sur. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int 2005;67:2089-100.
9. de Jong PE, van der Velde M, Gansevoort RT, Zoccali C. Screening for chronic kidney disease: where does Europe go? Clin J Am Soc Nephrol 2008;3:616-23.
10. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Kidney Dis 2003;41:1-12.
11. Coresh J, Selvin E, Stevens LA. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. JAMA 2007;7;298:2038-47.
12. Kes P; Bašić-Jukić N; Furić-Čunko V.Trajno nadomještanje bubrežne funkcije. Zagreb: TIPKO, 2011
13. Levey AS, Atkins R, Coresh J. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. Kidney Int 2007;72:247-59.

14. Gamulin S, Marušić M i sur. Patofiziologija, 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada 1998, 705-739.
15. Williams ME, Chronic Kidney disease/bone and mineral metabolism: The imperfect storm. Sem in Nephrol.2009;29:97-104.
16. Hamdy NA, Kanis JA, Benetn MN. Effect of alfacalcidiol on natural course of renal bone disease in mild to moderate renal failure. BMJ 1995;310:258-63.
17. Andress DL. Adynamic bone in patients with chrnoic kidney disease. Kidney Int. 2008;73:1345-54.
18. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients.Am J Transplant 2009;9 Suppl 3:S1-155.
19. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž i Vucelić B. Interna medicina. Zagreb: Medicinska naklada, 2008.
20. http://www.hdndt.org/hdndtindex.html
21. Stel VS, Kramer A, Zoccali C, Jager KJ.The 2007 ERA-EDTA Registry Annual Report—a Précis. NDT Plus. 2009; 2: 514–521.
22. Prommool S, Jhangri GS, Cockfield SM, Halloran PF. Time dependency of factors affecting renal allograft survival. J Am Soc Nephrol 2000;11:565-73.
23. Oosterlee A, Rahmel A. Eurotransplant International Foundation, Annual Report 2011. CIP-Gegevens Koniklijke bibliotheek, Den Haag; 1-116
24. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. N Engl J Med 2002:21;346:580-90.
25. Ponticelli C, Moia M, Montagnino G. Renal allograft thrombosis. Nephrol Dial Transplant 2009;24:1388-93.
26. Balachandra S, Tejani A. Recurrent vascular thrombosis in an adolescent transplant recipient. J Am Soc Nephrol. 1997;8:1477-81.
27. Sanni A, Wilson CH, Wyrley-Birch H. Donor risk factors for renal graft thrombosis. Transplant Proc 2007;39:138-9.
28. Lozano M, Oppenheimer F, Cofan F, i sur. Platelet procoagulant activity induced in vivo by muromonab-CD3 infusion in uremic patients. Thromb Res 2001 15;104:405-11.

29. Shankar R, Bastani B, Salinas-Madrigal L, Sudarshan B. Acute thrombosis of the renal transplant artery after a single dose of OKT3. Am J Nephrol. 2001 21:141-4.
30. Vaidya S, Sellers R, Kimball P i sur. Frequency, potential risk and therapeutic intervention in end-stage renal disease patients with antiphospholipid antibody syndrome: a multicenter study. Transplantation 2000 15;69:1348-52.
31. Verpooten GA, Cools FJ, Van der Planken MG i sur. Elevated plasminogen activator inhibitor levels in cyclosporin-treated renal allograft recipients. Nephrol Dial Transplant 1996 11:347-51.
32. Opatrný K Jr, Zemanová P, Opatrná S, Vít L. Fibrinolysis in chronic renal failure, dialysis and renal transplantation. Ann Transplant 2002 7:34-43.
33. Murphy BG, Hill CM, Middleton D, i sur. Increased renal allograft thrombosis in CAPD patients. Nephrol Dial Transplant.1994;9:1166-9.
34. Snyder JJ, Kasiske BL, Gilbertson DT, Collins AJ. A comparison of transplant outcomes in peritoneal and hemodialysis patients. Kidney Int. 2002;62:1423-30.
35. Palomar R, Morales P, Rodrigo E i sur. Venous graft thrombosis in patients on peritoneal dialysis before transplantation. Transplant Proc. 2007 Sep;39:2128-30.
36. Penny MJ, Nankivell BJ, Disney AP, Byth K, Chapman JR. Renal graft thrombosis. A survey of 134 consecutive cases. Transplantation. 1994 15;58:565-9.
37. Bakir N, Sluiter WJ, Ploeg RJ, van Son WJ, Tegzess AM. Primary renal graft thrombosis. Nephrol Dial Transplant. 1996;11:140-7.
38. McCarthy JM, Yeung CK, Keown PA. Late renal-artery thrombosis after transplantation associated with intraoperative abdominopelvic compression. N Engl J Med. 1990 27;323:1845.
39. Hedegard W, Saad WE, Davies MG. Management of vascular and nonvascular complications after renal transplantation. Tech Vasc Interv Radiol 2009;12:240-62.
40. Kahan BD, Ponticelli C. Principles and practice of renal transplantation. London, England: Martin Dunitz, 2000; 41-251.
41. Patel NH, Jindal RM, Wilkin T I sur. Renal arterial stenosis in renal allografts: retrospective study of predisposing factors and outcome after percutaneous transluminal angioplasty. Radiology. 2001;219:663-7.

42. Wong W, Fynn SP, Higgins RM i sur. Transplant renal artery stenosis in 77 patients--does it have an immunological cause? Transplantation. 1996; 61:215-9.
43. Humar A, Uknis M, Papaluis V i sur. Is there an association between cytomegalovirus and renal artery stenosis in kidney transplant recipients? Transplantation 2000;69:S289
44. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. N Engl J Med. 2010 Oct 7;363(15):1451-62.
45. Bhowmik DM, Dinda AK, Mahanta P, Agarwal SK. The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. Indian J Nephrol. 2010;20:2-8.
46. Racusen LC, Solez K, Colvin RB i sur.The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int. 1999;55:713-23.
47. Solez K, Colvin RB, Racusen LC i sur. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. Am J Transplant 2008;8:753-60.
48. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. Clin Microbiol Rev. 1997;10:86-124.
49. Parasurman R: Increasing trend in infection-related death-censored graft failure in renal transplantation. Transplantation 2011;91:94-99
50. Kahwaji J: Cause of death with graft function among renal transplant recipients in an intergrated healthcare system. Transplantation 2011; 91:225-230.
51. Kumar MS, Cridge P, Molavi A, Stephan R, Abouna GM. Infectious complications in the first 100 days after renal transplantation. Transplant Proc. 1995;27:2705-6.
52. Sousa SR, Galante NZ, Barbosa DA, Pestana JO. Incidence of infectious complications and their risk factors in the first year after renal transplantation. Bras Nefrol. 2010;32:75-82.
53. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. N Engl J Med. 1998; 338(24):1741-1751.
54. Avery RK. Infectious disease following kidney transplant: core curriculum 2010. Am J Kidney Dis 2010;55:755-71.
55. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. N Engl J Med 2002 21;346:580-90.

56. Morris PJ. Renal transplantation. In: Ginns LC, Cosimi AB, Morris PJ, eds. Transplantation. Malden, Mass.: Blackwell Science, 1999:285-311.
57. Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. J Am Soc Nephrol 1999;10:167-181.
58. Monaco AP, Burke JF Jr, Ferguson RM, et al. Current thinking on chronic renal allograft rejection: issues, concerns, and recommendations from a 1997 roundtable discussion. Am J Kidney Dis 1999;33:150-160.
59. Pascual M, Swinford RD, Ingelfinger JR, Williams WW, Cosimi AB, Tolkoff-Rubin N. Chronic rejection and chronic cyclosporin toxicity in renal allografts. Immunol Today 1998;19:514-519.
60. Gjertson DW, Cecka JM. Living unrelated donor kidney transplantation. Kidney Int 2000;58:491-499.
61. Humar A, Durand B, Gillingham K, Payne WD, Sutherland DE, Matas AJ. Living unrelated donors in kidney transplants: better long-term results than with non-HLA-identical living related donors? Transplantation 2000;69:1942-1945.
62. Kędzierska K, Domański M, Sporniak-Tutak K, Dołęgowska B, Ciechanowski K. Oxidative stress and renal interstitial fibrosis in patients after renal transplantation: current state of knowledge.Transplant Proc. 2011 43:3577-83.
63. McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, Campbell E, Ryan MP. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. Nephrol Dial Transplant. 2005;20:2215-25.
64. Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. Am J Pathol 2005;167:395-407.
65. Mohamed MA, Robertson H, Booth TA, Balupuri S, Kirby JA, Talbot D. TGF-beta expression in renal transplant biopsies: a comparative study between cyclosporin-A and tacrolimus. Transplantation 2000;69:1002-5.
66. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. Kidney Int. 1998;53:217-22.
67. Wissing KM, Abramowicz D, Broeders N, Vereerstraeten P. Hypercholesterolemia is associated with increased kidney graft loss caused by chronic rejection in male patients with previous acute rejection. Transplantation 2000;70:464-472.

68. Thuillier R, Mannon RB: The immunology of chronic allograft injury. N.l Ahsan. Eurekah Bioscience Database Chronic Allograft Failure: Natural History, Pathogenesis, Diagnosis and Management, Landes Biosciences, 2007
69. Freese P, Svalander CT, Molne J, Norden G, Nyberg G. Chronic allograft nephropathy-biopsy findings and outcome. Nephrol Dial Transplant 2001; 16:2401-2406.
70. Pagtalunan ME, Olson JL, Tilney NL, Meyer TW: Late consequences of acute ischemic injury to a solitary kidney. J Am Soc Nephrol 1999; 10: 366–373.
71. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Hallaron PF. Epitehlial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: The role of tubular cells in fibrogenesis. Am J Transplant 2005; 5:1367-1374.
72. Roxburgh SA, Murphy M, Pollock CA et al: Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis. The importance of epithelial cell plasticity and developmental genes. Nephron Physio 2006; 103:139.
73. Kalluri R, Neilson EG: Epithelial- mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J Clin Invest 2003:112; 1776.
74. Lui Y: Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism and therapeutic intervention. J Am Soc Nephrol 2004; 14:1.
75. Kingsley DM. The TGF-β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. Genes Dev. 1994;8: 133-146.
76. Moses HL, Yang EY and Pietenpol. TGF-β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. Cell 1990; 63:245-247.
77. Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applic ations of transforming growth factor-beta (TGF-beta). Growth factors 1993; 8:1-9.
78. Wahl SM, Hunt AD, Wong HL, Dougherty S, Cartney- Francis N, Wahl LM, Ellingsworth L, Schmidt JA, Hall G and Roberts AB. Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1 dependent lymphocyte proliferation. J Immunol 1988; 140:3026-3032.
79. Bottinger E, Blitzer M: TGF-β signaling in renal disease. J Am Soc Nephrol 2002; 13:2600.

80. Fan JM, Ng YY, Hill PA, et al: Transforming growth factor –beta regulateastubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. Kidney Int 1999; 56:1455.
81. Tyler JR, Robertson TA, Booth AD, Burt AD, Kirby JA: Chronic allograft nephropathy: Intraepithelial signals generated by transforming growth factor-β and bone morphogenetic protein-7. Am J Transplant. 2006; 6: 1367-1376.
82. Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS, Abboud HE. Expression of bone morphogenetic protein-7 m RNA in normal and ischemic adult rat kidney. Am J Physiol 1999; 276: F382-F389.
83. Hruska KA, Guo G, Woziak M, Martin D, Miller S, Liapis H, Loveday K, Klahr S, Sampath TK, Morrissey J. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 279: F130-F143.
84. Biykli NK, Tugtepe H, Cakalagaoglu F, Iki A, Alpay H. Dowregulation of the expression of bone morphogenetic protein 7 in experimental pyelonephritis. Pediatr. Nephrol 2005; 20: 1230-1236.
85. Ogutmen B, Tuglular S, Cakalagaoglu F, Ozener C, Akoglu E. Transforming growth factor, and bone morphogenetic protein-7 expression in tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats. Transplant Proc 2006; 38: 487-489.
86. Tuglular S, Gogas YD, , Cakalagaoglu F, Citak L, Arikan H, Kocak H, Ozener C, Akoglu E. Cyclosporine-A induced nephrotoxicity is associated with decreased renal bone morphogenetic protein-7 expression in rats. Transplant Proc 2004; 36: 131-133.
87. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Muller GA, Kalluri R. Bone morphogenetic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. Am J Physiol RenalPhysiol 2003; 285: F1060-1067.
88. Cai J, Terasaki PI. Induction immunosuppression improves long-term graft and patient outcome in organ transplantation: an analysis of United Network for Organ Sharing registry data. Transplantation 2010 124:649-54.
89. Truckenmiller ME, Princiotta MF, Norburry CC, Bonneau RH. Corticosterone impairs MHC class I antigen presentation by dendritic cells via reduction of peptide generation. J Neuroimmunol 2005; 160:48-60.

90. Truckenmiller ME, Bonneau RH, Norburry CC. Stress presents a problem for dendritic cells, corticosterone and thefate of MHC class I antigen processing and presentation. Brain Behav Immun 2006; 20:210-8.
91. Halloran PF.Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. N Engl J Med 2004; 351:2715-2729.
92. Nelson PH, Eugui E, Wang CC, Allison CD, Allison AC. Synthesis and immunosuppressive activity of some side-chain variants of mycophenolic cacid. J Med Chem 1990, 33:161-73
93. Gralla J, Wiseman AC. The impact of IL2ra induction therapy in kidney transplantation using tacrolimus- and mycophenolate-based immunosuppression. Transplantation 2010 27;90:639-44.
94. Kandus A, Arnol M, Omahen K i sur.Basiliximab versus daclizumab combined with triple immunosuppression in deceased donor renal transplantation: a prospective, randomized study. Transplantation 2010 Apr 27;89:1022-7.
95. Noël C, Abramowicz D, Durand D i sur. Daclizumab versus antithymocyte globulin in high-immunological-risk renal transplant recipients. J Am Soc Nephrol. 2009 Jun;20:1385-92.
96. Kainz A, Heinze G, Korbély R, Schwarz C, Oberbauer R. Mycophenolate mofetil use is associated with prolonged graft survival after kidney transplantation. Transplantation 2009 15;88:1095-100.
97. Opelz G, Döhler B; Collaborative Transplant Study. Influence of immunosuppressive regimens on graft survival and secondary outcomes after kidney transplantation. Transplantation 2009 27;87:795-802.
98. Marcén R, Teruel JL. Patient outcomes after kidney allograft loss. Transplant Rev (Orlando). 2008 Jan;22(1):62-72.
99. Johnson O, Rose C, Landsberg D, Gourlay WA, Gill JS. Nephrectomy after transplantation Failure: Current Practice and outcomes. Am J Transplant. 2007; 7:1961-1967.
100. Martinez UMJ, Lopez PP, Perdiguero M, Gutierrez E, Gar JME. Problems associated with nephrectomy of transplanted kidneys. Cir Pediatr 1995; 8:151-154.

101. Secin FP, Rovegno AR, del Rosario BM, Marrugat RE, Davalos MM, Fernandez H. Cumulative incidence, indications, morbidity and moratlity of transplant nephrectomy and the most appropriate time for graft removal: Only nonfunctional transplants that cause intractable complications should be excised. J Urol 2003; 169: 1242-1246.
102. Marcén R, Teruel JL. Patient outcomes after kidney allograft loss. Transplant Rev (Orlando). 2008;22:62-72.
103. Gregoor PJ, Kramer P, Weimar W, van Saase JL. Infections after renal allograft failure in patients with or without low-dose maintenance immunosupression. Transplantation 1997; 63:1528-1530.
104. Lopez-Gomez JM, Perez-Flores I, Jofre et al. Presence of a failed kidney transplant in patients who are on hemodialysis is associated with chronic inflammatory state and erythropietin resistnce. I Am Soc Nephrol 2004; 15:2494-2501.
105. Ayus JC, Achinger SG, Lee S, Sayegh MH, Go AS. Transplant nephrectomy improves survival following a failed renal allograft . J Am Soc Nephrol 2010; 21(2):374-80.
106. Kawabata M, Imamurea T, Miyazono K. Signal transduction by morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev 1998; 9:49-61.
107. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965; 150:893-9.
108. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL i sur. Bone morphogeenesis in implants of insoluble bonee gelatin. Proc Natl Acad Sci USA 1973; 70:3511-5.
109. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:1828-32.
110. Wozney JM, Rosen V, Celeste AL i sur. Novel regulators of bonee formation: molecular clones and activities. Scieence 1988; 242:1528-34.
111. Martinovic S, Simic P, Borovecki F, Vukicevic S. Biology of bone morphogeneetic proteins. U: Vukicevic S, Sampath TK ur. Bone morphogenetic proteins: regeneration of bone and beyond. Basel, Boston, berlin: Birkhauseer Verlag; 2004. 45-72.
112. Wozney JM. Overwieew of bone morphogenetic proteins. Spine 2002; 27:2-8.
113. Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone morphogenetic protein. Biochem Biophys Res Commun. 2007 26;362:550-3.
114. Chen D, Zhao M, harris SE, Zenghui MI. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. Front Biosci 2004; 9:349-58.

115. Zhao GQ. Consequeences of knocking out BMP signaling in the mouse. Genesis 2003; 35:43-56.
116. Nahar NN, Missana LR, Garimella R, Tague SE, Anderson HC. Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins. J Bone Miner Metab 2008;26:514-9.
117. Yanagita M. BMP antagonists: their rolee in developmeent and involvemeent in pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rew 2005; 16:309-17.
118. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell Signal 2011;23:609-20.
119. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. Cytokine Growth Factor Rew 2005; 16:251-63.
120. Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. Cytokine Growth Factor Rew 2000; 11:15-22.
121. Simic P, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in developmeent and homeostazis od kidney. Cytokine Growth Factor Rev 2005; 16:299-308.
122. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. Cell Signal 2004; 16:291-9.
123. Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGFβ-SMAD signaling. Trends Biochem Sci 2004; 29:265-273.
124. Hassel S, Schmitt S, Hartug A i sur. Initiation of Smad-depndent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complex. J Bone Joint Surg Am 2003;85:44-51.
125. Yanagita M. BMP antagonists: their role in developmeent and involvemeent in pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rew 2005; 16:309-17.
126. Hoy WE, Douglas-Denton RN, Hughson MD, Cass A, Johnson K i Bertram JF. A stereological study of glomerular number and volume; preliminary findings in a multiracial study of kidney autopsy. Kidney Int 2003;70:104-110.
127. Dudley AT, Robertson EJ. Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. Dev Dyn. 1997;208:349-62.

128. Cain JE, Bertram JF. Ureteric branching morphogenesis in BMP4 heterozygous mutant mice. J Anat. 2006;209:745-55.
129. Brenner-Anantharam A, Cebrian C, Guillaume R, Hurtado R, Sun TT, Herzlinger D. Tailbud-derived mesenchyme promotes urinary tract segmentation via BMP4 signaling. Development. 2007 May;134(10):1967-75.
130. Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Ichikawa I. Evidence that bone morphogenetic protein 4 has multiple biological functions during kidney and urinary tract development. Kidney Int. 2003 Mar;63(3):835-44.
131. King JA, Marker PC, Seung KJ, Kingsley DM. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. Dev Biol 1994;166:112-122.
132. Dudley AT, Lyins KM i Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. Genes Dev 1995; 9:2795-2807.
133. Simon M, Maresh JG, Harris SE i sur. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. Am J Physiol 1999; 276:382-9.
134. Wetzel P, haag J, Campean V i sur. Bone morphogentic protein-7 expression and activity in the human normal kidney is predominantly localized to the distal nephron. Kidney Int 2006; 70:717-23.
135. Vukicevic S, Basic V, Rogic D i sur. Osteogeenic protein-1 (bonee morphogeenetic protein-7) reduces severity of injury after ischaemic acute renal failure in rat. J Clin Invest 1998; 102:202-14.
136. Vukicevic S, Grgic M, Stavljenic A, Sampath TK. Recombinant human OP-1 (BMP-7) prevents rapid loss of glomerular function and improves mortality associated with chronic renal failure. J Am Soc Nephrol 1996; 7:A3102.
137. Wang SN, Lapage J, Hirschbeerg R. Loss of tubular bine morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. J Am Soc Nepehrol 2001; 12:2392-9.
138. Mathew S, Davies M, Lund R, Saab G, Hruska KA.Function and effect of bone morphogenetic protein-7 in kidney bone and the bone-vascular links in chronic kidney disease. Eur J Clin Invest. 2006;36 Suppl 2:43-50.

139. Basic-Jukic N, Radic-Antolic M, Hudolin T i sur. Immunolocalization and mRNA expression of bone morphogenetic protein-6 in huma clear cell renal carcinoma. Kidney Blood Press Res 2009; 32:445-50.
140. Yamasaki M, Nomura T, Mimata H, Nomura Y. Involvement of bone morphogenetic protein 2 in ossification of renal cell carcinoma. J Urol 2004;172:457-6.
141. Hruska KA, Guo G, Wozniak M et al. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 279: F130–F143.
142. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N et al. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. Am J Physiol Renal Physiol 2003; 285: F1060–F1067.
143. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. Nat Med 2003; 9: 964–968.
144. Wang S, Chen Q, Simon TC et al. Bone morphogenic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. Kidney Int 2003; 63: 2037–2049.
145. Yang YL, Liu YS, Chuang LY i sur.Bone morphogenetic protein-2 antagonizes renal interstitial fibrosis by promoting catabolism of type I transforming growth factor-beta receptors. Endocrinology. 2009;150:727-40.
146. Tabatabaeifar M, Schlingmann KP, Litwin M i sur. Functional analysis of BMP4 mutations identified in pediatric CAKUT patients. Pediatr Nephrol. 2009 Dec;24(12):2361-8.
147. Jevnikar AM, Mannon RB. Late kidney allograft loss: what we know about it, and what we can do about it. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3 Suppl 2:S56-67.
148. Wang Y, Chang CF, Morales M Bone morphogenetic protein-6 reduces ischemia-induced brain damage in rats. Stroke 2001;32:2170-8.
149. Markić D, Celić T, Spanjol J i sur.Expression of bone morphogenetic protein-7, its receptors and Smad1/5/8 in normal human kidney and renal cell cancer.Coll Antropol. 2010;34 Suppl 2:149-53.
150. Mitu GM,Wang S, Hirschberg R. BMP7 is a podocyte survival factor and rescues podocytes from diabetic injury. Am J Physiol Renal Physiol 2007; 293: 2392-2399.

151. De Petris L, Hruska KA, Chiechio S, Liapis H. Bone morphogenetic protein-7 delays podocyte injury due to high glucose. Nephrol Dial Transplant 2007; 22: 3342-3450
152. Basic-Jukic N, Hudolin T, Radic-Antolic M, Coric M, Zadro R, Kastelan Z, Pasini J, Bandic-Pavlovic D, Kes P. Bone morphogenetic protein-7 expression is down-regulated in human clear cell renal carcinoma. J Nephrol 2011; 24: 91-7.

10. POPIS KRATICA

ABMR	odbacivanje posredovano protutijelima (engl. antibody mediated rejection)
ACE	angiotenzin konvertirajući enzim
ARB	blokatori receptora angiotenzina
ATN	akutna tubularna nekroza
AZB	akutno zatajenje bubrega
BKV	BK virus
BMP	koštani morfogenetski protein (od eng. bone-morphogenetic protein)
BRAM1	engl. bone morphogenetic protein receptor associated molecule 1
BRE	engl. BMP responsive elements
CCP	klatrinom ovijene jamice (engl. clatrin coated pits)
CMV	citomegalo virus
DRM	engl. detergent resistant membranes
EBV	Ebstein-Barr virus
EGF	epidermalni čimbenik rasta (engl. epidermal growth factor)
EMT	epitelno mezenhimalna tranzicija
EPRICE	špa. Estudio Epidemiologico de la Insuficiencia Renal en Espana
ERK	izvanstanične signalom regulirane kinaze
FGF2	čimbenik rasta fibroblasta (engl. fibroblast growth factor)
FSGS	fokalna segmentalna glomeruloskleroza
GDNF	neurotropni čimbenika nastao iz gliadina (engl. gliadin derived neurotropic factor)
GF	glomerularna filtracija
HGF	čimebnik rasta hepatocita (engl. hepocyte growth factor)
HIV	virus humane imunodeficijencije
HLA	ljudski leukocitni antigen (engl. human leukocyte antigen)
HSV	Herpes simplex virus
HUNT	eng. North Trondelag Health Study
IFTA	intersticijska fibroza i tubularna atrofija
IL-2	interleukin-2

JNK	C-jun N-terminalna kinaza
KDIGO	eng. Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KUf	koeficijent ultrafiltracije
KZB	kronično zatajenje funkcije bubrega
MHC	glavni sustav histokompatibilnosti (engl. main histocompatibility compex)
MMF	mikofenolat mofetil
MSCT	višeslojna kompjuterizirana tomografija
NHANES III	eng. Third National Health and Nutrition Examination survy
PRA	postotak reaktivnih antitijela (eng. Percent reactive antibody)
PREVEND	eng. Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease
PTH	paratiroidni hormon
SHPT	sekundarni hiperparatiroidizam
SME	engl. Smad DNA binding element
TAK1	engl. TGF-beta activated kinase 1
TCMR	akutno odbacivanje posredovano T limfocitima (engl. T-cell-mediated rejection)
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta beta (engl. transforming growth factor beta)
VZV	Varicella-Zoster virus
WT	gen za Wilmsov tumor
XIAP	engl. X-linked inhibitor of apoptosis protein

11. ŽIVOTOPIS

Vesna Furić Čunko, dr. med. rođena je 13. rujna 1979. godine u Houstonu, Texas, SAD. Maturirala je u lipnju 1998.g u 15. Gimnaziji u Zagrebu. Upisala je studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1998.g i diplomirala u lipnju 2004.g s prosjekom 4,6. Pripravnički staž je obavila u KB "Sestre milosrdnice" i položila stručni ispit 2006.g. Od 2005.g do 2007.g zaposlena je kao dekanov znanstveni novak-asistent u Zavodu za histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Specijalizaciju interne medicine započela je 2007.g u KBC Zagreb - Rebro. Poslijediplomski doktorski studij upisala je 2005.g na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Objavila je 4 CC rada, 6 radova u drugim indeksiranim časopisima, 3 sažetka u CC časopisima, 3 rada u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom i 8 sažetaka u zbornicima skupova. Koautor je 1 priručnika i 1 pogavlja u knjizi. Sudjeluje u nastavi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Članica je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Hrvatskog mikroskopijskog društva i Hrvatskog društva za hiperteziju. Udana je i ima jedno dijete.