UTJECAJ IMUNOSUPRESIJE I GENOTIPA NA IZRAŽAJ TLR4 U BOLESNIKA S TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM

Prlić, Damir

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:779322

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Damir Prlić

UTJECAJ IMUNOSUPRESIJE I GENOTIPA NA IZRAŽAJ TLR4 U BOLESNIKA S TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM

doktorska disertacija

Osijek, 2013.g.

Mentor: prof. dr. sc. Jerko Barbić, dr. med.

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Jerku Babiću, dr. med., na velikoj pomoći i poticaju pri izradi ove disertacije.

Velika hvala stručnim suradnicima bez kojih ovo istraživanje ne bi bilo izvedivo, osobito Blaženki Dobrošević,dipl. ing., i svim djelatnicima Odjela medicinske biokemije.

Zahvaljujem svojoj velikoj prijateljici prof. dr. Ladi Zibar, dr. med., na izuzetno velikoj pomoći i motivaciji, koja mi je bila velika podrška u životu, a ne samo u statisitičkom djelu izrade ovog istraživanja. Hvala dragoj Kristini Kralik, prof., na statističkoj i moralnoj podršci.

Hvala predstojniku mog odjela, prim. dr. sc. Marku Jakiću, dr. med., i osoblju Kliničkog odjela za dijalizu Kliničkog bolničkog centra Osijek na razumijevanju i pomoći.

Iskrena hvala prof. dr. sc. Antunu Tucaku, dr. med., jer se potrudio da mi ovaj rad bude imperativ, a prof. dr. Josipu Galiću, dr. med., zahvaljujem na dodatnoj podršci.

Nadasve hvala mojim pacijentima – ispitanicima na strpljivoj suradnji. Nadam se da će ovo biti barem malen doprinos njihovu boljitku.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Transplantacija bubrega 4

1.2. Kirurške komplikacije 6

1.3. Imunosni sustav 10

1.4. Transplantacijska imunologija 12

1.5. Imunosupresivno liječenje 13

1.5.1. Kortikosteroidi 14

1.5.2. Inhibitori kalcineurina 14

1.5.3. Antiproliferativni lijekovi 15

1.5.4. TOR inhibitori 15

1.6. TLR receptori (TLRs, od engl. Toll-like receptors) 16

1.7. Građa Toll-like receptora 18

1.8. Polimorfizmi unutar gena za Toll-like receptore 19

1.9. Signalizacija putem Toll like raceptora 19

1.10. TLR i transplantacija bubrega 21

2. HIPOTEZE 24

3. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA 25

4. ISPITANICI I METODE 26

4.1. DNA analiza 27

4.2. Standardna biokemijska analiza 27

4.3. Obrada podataka i statistička analiza 28

4.4. Protokol istraživanja 28

5. **REZULTATI** 30

5.1. Osnovna obilježja ispitanika s presađenim bubregom 30

5.2. Osnovna obilježja darivatelja bubrega 32

5.3. Osobine darivatelja i funkcija presađenog bubrega 35

5.4. Protočna citometrija perifernih monocita 35

5.5. Lijekovi koje bolesnici uzimaju u trenutku protočne citometrije 36

5.6. Utjecaj vremena proteklog od transplantacije na izražaj tlr4 receptora 38

5.7. Genotipizacija gena za tlr4 38

5.8. Povezanost genotipa za tlr4 i izražaj receptora TLR4 i CD14 na monocitima periferne krvi 39

5.9. Biokemijsko hematološki parametri periferne

krvi u trenutku protočne citometrije 41
5.10. Komplikacije nakon transplantacije 44
5.11. Hladna ishemija i funkcija bubrežnog presatka 50
6. RASPRAVA 51
6.1. Uvod u raspravu 51
6.2. Polimorfizam gena tlr4 51
6.3. Izražaj tlr4 na monocitima periferne krvi 54
6.4. Funkcija bubrežnog presatka i pobol bolesnika s bubrežnim presatkom 57
6.5. Hladna ishemija i kirurške komplikacije 58
7. ZNAČAJ ISTRAŽIVANJA U KLINIČKOM RADU 61
8. ZAKLJUČAK 62
9. SAŽETAK 64
10. **SUMMARY** 66
11. LITERATURA 68
12. ŽIVOTOPIS 77
13. POPIS KRATICA 78

1. UVOD

Završni stupanj bubrežnog zatajenja je moguće nadomjestiti bubrežnim presatkom, međutim takav postupak nije bez težine. Naime, presađeni je organ u stalnoj opasnosti od odbacivanja i ozlijede izazvane terapijom i komorbiditetima primatelja. Odbacivanje ili tolerancija presatka dvije su različite mogućnosti u transplantaciji organa, a rezultat su različitih načina reagiranja imunosnog sustava na presađeni organ (1).

Glavni uzrok kasnog zatajivanja presatka je *kronična nefropatija presatka* (CAN, od engl. *chronic allograft nephropathy*). Kronična nefropatija presatka posljedica je kumulativnog oštećenja presatka i to zbog djelovanja imunosnih mehanizama (npr. reakcije akutnog ili kroničnog odbacivanja, nedostatno imunosupresivno liječenje), ali i neimunoloških čimbenika (npr. dob darivatelja, veličina presatka, trajanje hladne ishemije, nefrotoksičnost lijekova, arterijska hipertenzija, hiperlipidemija, šećerna bolest, infekcije, povratna ili novonastala glomerularna bolest, kirurške komplikacije te navike samog primatelja) (2).

Precizna uloga imunosnih posrednika u nastanku kronične nefropatije presatka tek je djelomice poznata. Može se reći kako glavnu ulogu u pobudi imunosnog sustava primatelja imaju promjene tkiva presatka koje ga čine imunogeničnijim. Ove promjene mogu nastati zbog više razloga ozljede tkiva kao što su: način čuvanja tkiva, trajanje ishemije, te nastanka ishemijsko/reperfuzijske ozljede tkiva nakon presađivanja organa. Važno je naglasiti kako tkivnu promjenu građe presatka mogu izazvati i različiti komorbiditeti primatelja (hipertenzija, šećerna bolest, navike), ali i neželjeni učinci imunosupresijske terapije. Novije spoznaje govore u prilog tome kako endogena (izazvana različitim bolestima) ili egzogena ozljeda tkiva (najčešće izazvana infekcijom nakon transplantacije) izaziva oslobađanje takozvanih signala opasnosti (tzv. egzogeni ili endogeni *alarmini*) koji pobuđuju snažni upalni odgovor vezivanjem za receptore na stanicama prirođene imunosti koji su poznati kao receptori slični Toll-u (TLR, skraćeno od engl. *Toll like receptors*). Prema ovakvom modelu opasnosti aktivacija putem TLR ima ključnu ulogu u aktivaciji stečene imunosti, pa tako i aloimunosti.

Na važnost TLR sustava ili sustava prepoznavanja opasnosti ukazuju istraživanja prema kojima ključnu ulogu u ishemijsko/reperfuzijskoj ozlijedi presatka ima signalizacija putem TLR4 receptora (3). U skladu s takvim spoznajama, a u nastojanju terapijske kontrole komplikacija presađivanja, razvijaju se antagonisti TLR4 *(npr. eritoran)* koji se pokušavaju uporabiti u kliničkoj praksi radi smanjenja ishemijsko/reperfuzijske ozljede i posljedično kasnijeg nastanka kronične nefropatije presatka (4).

Brojna istraživanja ukazuju kako genska determinacija (genotip primatelja i donora) i način imunosupresije utječu na preživljenje alografta. Tradicionalno su se genotipske osobine primatelja i davatelja presatka povezivale s genima HLA sustava (HLA, skraćeno od engl. *human leukocyte antigens*). Međutim, novije spoznaje ukazuju na važnost građe gena različitih molekula izvan HLA sustava uključenih u imunosni odgovor kao što su TLR, što je i glavno područje predloženog istraživanja. Slično tome naša je istraživačka skupina ukazala na važnost genskog polimorfizma unutar gena za IFN-γ u funkcioniranju bubrežnog presatka (5,6,7).

Specifična imunost prema alograftu rezultat je sposobnosti limfocita T da prepoznaju molekule glavnog kompleksa tkivne snošljivosti (HLA). Prirođeni odgovor imunosnog sustava je neovisan o antigenu i temelji se na receptorima koji prepoznaju konzervirane molekulske obrasce (PRR, od engl. *pattern recognition receptors*) (8). Receptori TLR pripadaju skupini PRR, a ova se veleskupina receptora sastoji od 10 članova koji imaju zajedničku strukturu i zajednički signalni dio. Smatra se da je uloga prirođene imunosti stvaranje brzog obrambenog odgovora i poticanje aktivacije stečene imunosti, što je dobro istraženo u imunosti kod infekcija. U ovom modelu aktivacija preko TLR stvara imunogeničnu sredinu koja pobuđuje stanice koje predočavaju antigen i posljedično tomu aktivaciju limfocita T i B, kao središnjih stanica stečene imunosti. Modulacija prirođene imunosti u transplantacijskoj imunologiji izazvana imusupresijskom terapijom slabo je poznata. Nedavno je pokazano da se molekule koje nisu mikrobnog podrijetla, tzv. molekule DAMP (DAMP, skraćeno od engl. *damage associated molecular patterns*), kao što su proteini toplinskog šoka (HSP60), *high mobility group box chromosomal protein 1* (HMGB1), oslobađaju se tijekom ishemijske ozljede ili zbog nekrotične smrti stanica presatka, a tako oslobođene molekule vežu se za tlr4 i aktiviraju mehanizme prirođene i stečene imunosti (sterilna aktivacija prirođene imunosti, ili aktivacija putem endogenih

alarmina ili endogenih signala opasnosti) (9,10). Prema tome građa gena za tlr4 može utjecati na funkciju ovog receptora. Tlr4 gen je veličine 13,305 kb i nalazi se na 9. kromosomu (9q32-q33), na kromosomskoj poziciji 120,466,460-120,479,764. On se sastoji se od 4 egzona i 3 introna. Prijepis mRNA veličine je 2,8kb (*www.genome.ucsc.edu, posljednji pristup 12. siječnja 2011.g.*). Polimorfizam uzrokovan promjenom jednog nukleotida (jednostruki nukleotidni polimorfizam, od *engl. single nucleotide polymorphism*) tlr4 (Asp299Gly ili Thr399Ile) dovodi do smanjenog odgovora na LPS (11).

Do sada je poznato 277 SNP-ova ovoga gena u ljudi (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov., posljednji pristup 14. studenog, 2010.*). Većina varijacija događa se u vanjskome dijelu receptora u egzonu 3 koja je odgovoran za vezanje s ligandom (12). Do sada su najviše istraživana dva nesinonimna polimorfizma koja imaju učestalost veću od 1%. To su SNP896A/G(Asp299Gly; rs4986790) i SNP1196C/T(Thr399Ile; rs4986791). Učestalost ostalih nesinonimnih varijacija manja je od 1% (13). Prema podacima NCBI (od engl. *National Centre for Biotehnology Information*) u genotipskoj distribuciji SNP896A/G za tlr4 gen u bjelaca europske populacije zastupljenost AA genotipa je 0,933±0,04, a AG genotipa je 0,067±0,04. Učestalost 1196C/T za tlr4 gen je manja. Nema dostupnih podataka (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov., posljednji pristup 14. studenoga, 2010.*). Postoji značajna razlika u geografskoj distribuciji ovih SNP-ova. Tako se u Europi nalazi predominantno Asp299Gly/Thr399Ile haplotip, u Africi Asp299Gly/WT haplotip koji je drugi SNP u haplotipu, a u Aziji nema niti jednoga od ovih SNP-ova.
Štoviše, dokazana je stimulacija tlr4 nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede, kirurške ozljede, sustavnog stresa ili moždane smrti, s posljedičnom pobudom upalnog odgovora (10,14). Važno je naglasiti kako je, tragom ove hipoteze, naša istraživačka skupina ranije utvrdila značajnost genskog polimorfizma u sustavu tlr4 i tlr2 u razvitku arterijske hipertenzije i akutnog infarkta miokarda (15). Poznato je kako arterijska hipertenzija može imati značajnu ulogu u nastanku kronične nefropatije grafta. Na temelju iznešenog, za očekivati je da će tlr4 imati važnu ulogu i u imunologiji bolesnika s transplantiranim buburegom.

Utjecaj pojedinačnih polimorfizama unutar gena za tlr4 na funkciju bubrežnog presatka ispitivan je u različitim skupinama transplantiranih bolesnika, ali su dobiveni podatci kontradiktorni (16,17,18). Ispitivan je utjecaj genotipa za tlr4 na izražaj ovog receptora na različitim stanicama i kod različitih bolesti (19,20). Pokazano je da nefrotoksičnost

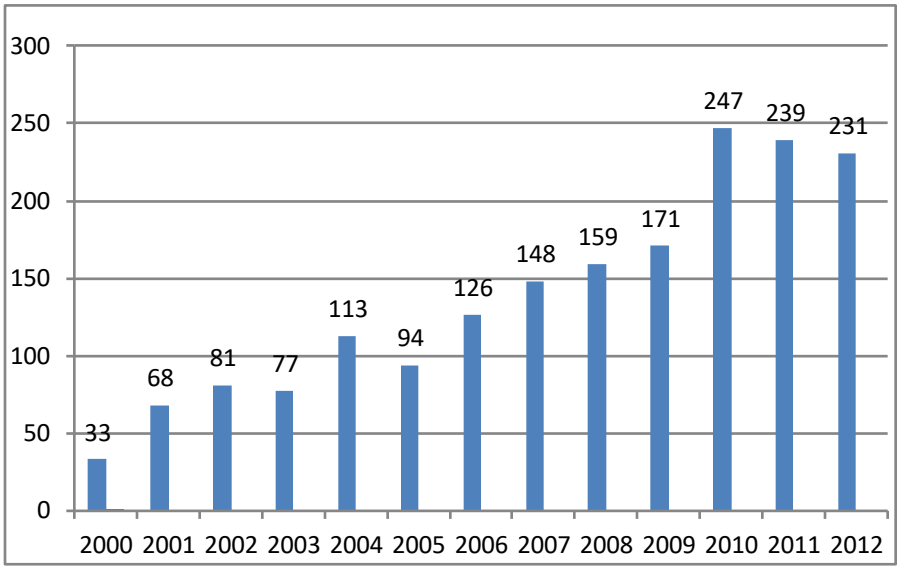
ciklosporina u transplantiranom bubregu može biti povezana s povećanim izražajem tlr4 na epitelnim tubularnim stanicama bubrega ili pak s povećanom proizvodnjom mRNA u tkivu bubrega za tlr4. Prema nama dostupnim podatcima postoji vrlo malo podataka o utjecaju genotipa i imunosupresije, te vremena proteklog od transplantacije na izražaj tlr4 na perifernim mononuklearima kod bolesnika s transplantiranim bubregom (21).

Ovakvo postavljeno istraživanje nastoji utvrditi biomarkere koji bi mogli biti jednostavni pokazatelji tolerancije odnosno prihvaćanja bubrežnog transplantata, a samim time i modificiranja imunosupresijske terapije

1.1. Transplantacija bubrega

Transplantacija bubrega najbolje je nadomjesno riješnje kod bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem. Ono ne predstavlja potpuno izliječenje i može biti povezano s nizom komplikacija koje se mogu javiti u ranoj ili kasnoj fazi iza transplantacije. Prva transplantacija u svijetu učinjena je u Sjedinjenim Američkim državama, u Bostonu 1954. godine. Učinio ju je Joseph Murray i za to 1990. dobio Nobelovu nagradu (22).

U Hrvatskoj prva transplantacija bubrega sa živog davatelja učinjena je u Rijeci 1971. godine (23). Od 2007. godine transplantacije bubrega vrše se i na Klinici za urologiju KBC Osijek. Broj transplantacija u Hrvatskoj neprestano raste zahvaljujući izvrsno razvijenoj mreži eksplantacijsko-transplantacijskih timova, te permanentnim educiranjem populacije o potrebitosti eksplantacija. Republika Hrvatska od 2007. godine punopravni je član organizacije Eurotransplant. (Slika 1).



Slika 1. Broj transplantacija u RH u periodu 2000.-2012., podaci Ministarstvo zdravlja RH

Prihvaćanje fleksibilnijih kriterija za uzimanjem organa (takozvani mariginalni darivatelji, odnosno darivatelji starije životne dobi, zatim darivatelji s arterijskom hipertenzijom, bubrežnom disfunkcijom ili produljenom hladnom ishemijom) predstavlja novi izazov u liječenju transplantacijom bubrega.

U prvoj godini nakon transplantacije najčešći uzroci gubitka presatka su akutno odbacivanje, arterijska tromboza, primarna afunkcija presatka ili smrt bolesnika (24). Nakon prve godine najčešći uzroci gubitka presatka su smrt bolesnika i kronična nefropatija presatka. Kao najčešći uzroci smrti kod transplantiranih bolesnika nalazimo srčanožilne bolesti, zatim infekcije i zloćudne tumore. Transplantirani bolesnici stoga u cilju otkrivanja ranih komplikacija nakon operacije zahtijevaju redovito kliničko praćenje koji uključuje osim rutinskog labaratorija i određivanje razine imunosupresivnih lijekova, te ultrazvučne preglede obojenim doplerom.

Nakon transplantacije bolesnici obično ulaze u poliuričnu fazu koja se postepeno smanjuje. To za posljedicu ima snižavanje razine kreatinina. Oprez je potrebno s obzirom na mogućnost hipovolemije koja se može posljedično javiti. Produljena ishemija presađenog bubrega uzrokuje akutnu tubularnu nekrozu koja se tada očituje kao odgođeno preuzimanja funkcije presatka, a posljedično tomu bolesnik postaje oliguričan.

Naravno da je u slučaju javljanja oligurije potrebno isključiti i druge moguće uzroke pogoršanja ili gubitka funkcije transplantiranog bubrega. U prvom redu to se odnosi na eventualnu opstrukciju mokraćnih puteva, eventualnu trombozu krvnih žila ili druge poremećaje cirkulacije.

1.2. Kirurške komplikacije

Svjedoci smo kako se zadnjih nekoliko desetljeća značajno poboljšalo preživljavanje presatka i primatelja presađenog bubrega a sve je to djelomice rezultat standardizacije kirurških tehnika transplantacije. Kirurške komplikacije koje se mogu javiti kod transplantacije mogu klinički biti vrlo slične akutnom odbacivanju presatka. U takvim situacijama potrebno je isključiti različite vaskularne i urološke komplikacije (25).

Suvremeni izazovi u transplantacijskoj kirurgiji vezani su uz marginalne darivatelje, a isto tako i uz anatomske varijante presatka kao što su više bubrežnih arterija i uretera ili pak anastomoze s ilealnim ili kolon *conduitom*. Presađivanje takvih organa povezuje se s nastankom kirurških komplikacija.
Više bubrežnih arterija mogu se naći u 18-30% potencijalnih bubrežnih darivatelja (26).
Vaskularne ili kirurške komplikacije vezane su upravo uz ovakve presatke bubrega. Presađivanje bubrega s više krvnih žila ima nekoliko nedostatka kao što su produljenje tople ishemije, povećana incidencija akutne tubularne nekroze, smanjenje funkcije presatka i dulje vrijeme hospitalizacije. Osim toga, vaskularne komplikacije kao što su arterijska tromboza ili stenoza bubrežne arterija češće su kod presađivanja bubrega s više krvnih žila (27,28).
Vaskularne komplikacije kao što je tromboza mogu se naći u 5.2% transplantiranih bolesnika u prvih 10 dana nakon transplantacije, a graftektomija je učinjena u 66% bolesnika (29).
Osim toga, anatomske varijante kao što je polarna arterija mogu se povezati i sa nastankom infarkta presatka, infekcije ali i s nastankom uroloških komplikacija kao što su kalikealna ili ureteralna fistula ili pak ureteralna nekroza (30) .

Trenutno postoji nekoliko različitih vaskularnih, kirurških i mikrokirurških tehnika za unutar tjelesnu ili *ex vivo* vaskularnu anastomozu koje rezultiraju dobrom funkcijom presatka koja se može usporediti i sa presađenim organima s jednom krvnom žilom (31).

Ipak može se reći kako se krvarenja najčešće javljaju u prva dva dana iz operacije i najčešće je posljedica oštećenja manjih krvnih žila u hilusu bubrega nastalih preparacijom i pripremom presatka za transplantaciju. Rijetko se javlja kao posljedica popuštanja anastomoza na krvnim žilama. Krvarenja ukoliko su obilnija za posljedicu mogu imati pad hemograma i potrebu nadoknade filtriranim eritrocitima. Pojačana sekrecija na dren ili eventualni edem rane s razvojem subkutanog hematoma ukazuju na to. Rutinskim UZV pregledom ili CT-om moguće je dijagnosticirati eventualno nastajanje perirenalnog hematoma. Osim korekcije hemograma, koagulacije ponekad je potrebno učiniti i kiruršku reviziju radi evekuacije hematoma i eventualnog zbrinjavanja mjesta krvarenja. Krvarenja koja nastaju u kasnijem perioperativnom tijeku obično zahtijevaju hitnu kirurško intervenciju s graftektomijom
Tromboza arterijskih krvnih žila presatka nastaje najčešće u prvih nekoliko dana iza transplantacije. Manifestira se naglim prestankom mokrenja i porastom dušičnih vrijednosti u krvi. Najčešće nastaje kao posljedica oštečenja intime arterija tijekom transplantacije. Perioperativno se redovito vrši profilaksa heparinom u cilju smanjenja razvoja ove komplikacije. Hitnim ultrazvučnim pregledom doplerom ova komplikacije se može verificirati. Ona obično zahtjeva hitan kirurški zahvat i najčešće graftektomiju.
Tromboza vene karakterizirana je također smanjenjem diureze, otjecanjem presatka, bolovima, razvojem eventualnog subkapsularnog hematoma i makrohematurijom. Hitnim kirurškim zahvatom koji je potreban u takvim situacijama rijetko se može izvesti uspješna trombektomija s revizijom anastomoze, odnosno najčešće se učini graftektomija.

Razvoj stenoze arterije presatka ili ilijačne arterije ima za posljedicu pogoršanje funkcije presatka s razvoje hipertenzije. Ovu komplikaciju moguće je dijagnosticirati UZV obojenim dopler pregledom ili angiografijom. Pri zbrinjavanju ove komplikacije moguće je učiniti ponekad endoskopsku operaciju s postavljanjem stenta ili otvoreni zahvat s revaskularizacijom.

Presađivanje bubrega zahtjeva implantaciju uretera u mokraćni mjehur i to se obično učini sa anti-refluks uretreoneocistostomijom. Postoji nekoliko tehnika ureteroneocistostomije kao na primjer tehnika po *Lich-Grigor* ili pak ekstrveziklani pristup po *Barry-Tagochi*.
Urološke komplikacije kao što su *leak* urina, stenoza uretera ili nastanak refluksa mogu se povezati s tehnikom rekonstrukcije mokraćnog sustava (32).

U istraživanjima velikog broja ispitanika različite urološke komplikacije mogu se naći 2.9 do čak 21% transplantiranih bolesnika (33,34,35).
Važno je naglasiti kako se 80% uroloških komplikacija događa u prva 2 tjedan nakon transplantacije bubrega.
Već i hitan UZV obojenim doplerom može nam dati puno podataka o eventulanim razlozima poremećene funkcije presatka. Nakupljanje tekućine oko presatka, hematom, razvoj urinoma ili apscesa za posljedicu može imati razvoj hidronefroze s hipofunkcijom presatka. U slučaju postavljanja sumnje na insuficijenciju ureterocistoneostomije potrebno je učiniti retrogradnu ili anterogradnu ureteropijelografiju. Razvoj eventualne fistule na mjestu anastomoze može se dokazati cistografijom. Reek i suradnici smatraju kako su dva glavna uzroka nastanka leaka urina i rane ureteralne obstrukcije vezane uz kiruršku tehniku (eksplantacija organa i ureteralna implantacija) i ishemiju uretera.

Važno je naglasiti kako nakon transplantacije bubrega je povećani rizik nastanka poremećaja cijeljenja kirurške rane koja je u najvećoj mjeri posljedica uporabe imunosupresivnih lijekova posebice steroida ili mikofenolata i inhibitora proliferacije limfocita (36,37). Poremećaji cijeljenja rane mogu dovesti do dehiscijenicije rane, zatim mogu izazvati nastanak seroma i infekcija rane, a također mogu rezultirati nastankom limfocele.

U literaturi je poznato kako i kirurška tehnika (uključujući i vrstu incizije kože u obliku slova J ili zavijena) može utjecati na nastanak različitih kirurških komplikacija (38,39). Infekcije rane češće su kod pretilih osoba i javljaju se u manje od 1% slučajeva. Nastanak kirurških komplikacija vezan je i uz indeks tjelesne mase, tako da neki centri određuju ITM<30 kg/m^2 kao preduvjet za stavljanje bolesnika na listu za presađivanje organa (40).

Limfocela predstavlja kolekciju limfe u okolici presađenog bubrega ili mokraćnog mjehura. Limfocele nastaju od limfe iz limfatičkih žila u sinusu transplantiranog bubrega ili pak limfnih žila koje prate ilijačne krvne žile primatelja. U literaturi su različiti podatci o učestalosti limfocele od 1%–2% do čak 20%. Čimbenici koji se povezju s nastankom limfocele povezani su sa akutnim odbacivanjem, trajanju operacijskog zahvata, veličini disekcije tkiva i o uporabi imunosupresivnih lijekova (41,42). Male limfocele često su

asimptomatske i ne zahtjevaju kiruršku intervenciju, dok velike mogu komprimirati presađeni bubreg te tako izazvati hidronefrozu i pogoršanje bubrežne funkcije (43). Liječenje ovisi o veličini limfocele i kliničkim manifestacijama iste. Ono obuhvaća aspiraciju s postavljanjem drenaže i instilacijom sklerozirajućeg sredstva. Veće limfocele koje nisu pogodne za perkutanu drenažu mogu se riješavati laparoskopskom drenažom u peritonejsku šupljinu.

Perkutana drenaža limfocele povezana je velikom incidencijom ponovnog nastanka (u 50 pa čak do 100%) slučajeva. Neki autori preporučuju laporaskopsku marsuplizaciju limfocele kao prvu liniju terapije (44).

Stvaranje urinoma najčešće je posljedica nekroze distalnog dijela uretera ili tehničkih problema pri konstrukciji ureterocistoneostomije. Manifestira se smanjenom diurezom, pojačanom sekrecijom na drenažu ili stvaranjem kolekcije koja se može ultrazvučno verificirati oko bubrega. Dijagnoza se može postaviti i biokemijskom analizom sadržaja drenaže, odnosno radioizotopnim ispitivanjem bubrega, cistografijom ili eventualno intravenskom infuzijom indigo karminom. Opisana komplikacija zahtjeva kiruršku reviziju i reanastomozu uretera.

Opstrukciju otjecanja mokraće iz transplantiranog bubrega mogu prouzročiti i posve banalne stvari kao začepljenje katetera eventualnom ugruškom, ali i stenoze koje se mogu javiti na mjestu anastomoze, a posljedica su nekorektno izvedene operativne tehnike ili eventualnog edema na mjestu anastomoze. U kasnijem postoperativnom tijeku razlog opstrukcije može biti fibroza mokraćovoda kao posljedica ishemije, infekcije ili reakcije odbacivanja. Ovisno o stupnju opstrukcije, uzroku, kliničkoj slici i mjestu opstrukcije eventualno je potrebno učiniti intervenciju koja je najčešće kirurška.

U kirurgiji transplantacije bubrega u novije vrijeme pokušava se smanjiti kirurška trauma tkiva. Smanjenje kirurške traume povezuje se sa boljim kozmetskim rezultatom operacije, ali se povezuje i sa smanjenim brojem postoperacijskih hernija nastalih na opertivnom rezu te ostalih urooloških i vaskularnih komplikacija. Od 2008. godine razvijaju se različite tehnike minimalnog pristupa za transplantaciju bubrega (MAKT, od engl. minimal access kidney transplant technique), a jednako tako i robotske tehnike transplantacije bubrega (45).

1.3. Imunosni sustav

Imunosni sustav kod čovijeka može se u podijeliti na dva osnovna sustava. Njega čine nespecifični ili urođeni (engl. innate immunity) i spcifični ili stečeni (engl. arcquired immunity).

Urođeni imunosni sustav karakterizira to da je on filogenetski stariji i funkcionira po principu prepoznavanja tzv. konzerviranih struktura koje evolucijski pripadaju stranim organizmima, tako da ne može doći do zamjene sa domaćinom. Među te strukture ubrajamo lipoproteine, lipopolisaharide, lipide, proteine, bakterijski DNA, virusni RNA i dr. Zajednički se nazivaju PAMP-ovi (molekulski obrasci spcifični za patogen, od engl. pathogen-associated molecular patterns) (46).

Na gotovo svim stanicama domaćina, a naročito na imunopredočnim stanicama (B-limfociti, makrofagi i dendritične stanice) nalaze se PRR receptori (receptori koji prepoznaju obrazac, od engl. pattern recognition receptors) koji prepoznaju PAMP-ove i usmjeravaju imunosnu reakciju u nekoliko smjerova. Ove reakcije čine prvu liniju obrane i započinju unutar nekoliko sati. Prema izvršnoj reakciji PRR-i dijele se na sekrecijske, endocitičke i signalne (TLR, NOD).

Stečeni imunosni sustav karakterizira spcifična reakcija na određni antigen, a ona se odvija putem T i B limfocita. Stvaranjem tzv. imunogeničnog sklopa na imunopredočnim stanicama peptidi prerađenog antigena vežu se s HLA alomorfima s posljedičnom pobudom CD4+ limfocita T po ostvarivanju reakcije s antigenom. Za potpunu aktivaciju limfocita T dodatno je potreban signal koji nastaje putem kostimulacijskih molekula na antigenom aktiviranim imunopredočnim stanicama koji se ostvaruje pobudom urođene imunosti. Pri aktivaciji specifičnog imunosnog sustava dolazi do umnažanja limfocita T s posljedičnim lučenjem brojnih citokina koji određuju nekoliko tipova obrazaca reagiranja: Th1, Th2 i Th17 (od engl. T helper cells) u različitim izvršnim imunosnim reakcijama.

U Th1 tipu odgovora izlučuju se IL-2, TNF-a i INFγ s razvojem zaštitnih protutijela i citotoksičnih limfocita T. Na ovaj način ostvaruje se specifičnom imunosnom sustavu svojstvena memorija imunosnog odgovora koja nakon prvog izlaganja antigenu aktivira se

nakon 4-10 dana. Zbog nastanka memorijskih limfocita T pri svakom ponovnom izlaganju antigenu vrijeme imunosne reakcije se smanjuje.

U Th2 tipu odgovora izlučuju se IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13. Oni dovode do pobude limfocita B, zatim mastocita i eozinofila s nastankom IgE protutijela (47,48).
Citokin INFγ koji se luči u Th1 tipu odgovara koči Th2 tip odgovora, a citokin IL-4 koji je specifičan Th2 odgovora koči Th1 imunosnog odgovora. Prema dosadašnjim spoznajama, u ovoj situaciji dolazi do natjecanja koji će tip odgovora prevladati što je povezano sa prisutnošću citokina u okolišu. Poznato je da IL-12 potiče odgovor Th1, dok IL-4 potiče Th2 tipa reakcije. Th1 oblik reakcije je zapravo fiziološki odgovor zdrave osobe, a ukoliko ne dođe do njegove pobude prevladaće Th 2 tip odgovora.

Th17 je otkiven unazad nekoliko godina i karakterizira ga proizvodnja IL-17, a značajan je u autoimunim bolestima. Ovaj tip odgovora izlučuje citoskine TGFb, IL-6,IL-21,IL-23 te IL-1β.
Poznato je da PRR na dendritičkim stanicama može nastati i bez pobude stranih patogena, odnosno iste mogu biti pobuđene i nekrotičnim stanicama (49).

Za organizam je karakteristično i to da posjeduje mehanizme kojima se smanjuje upala. Možemo ih podijeliti na izvastanične (upalostatički citokini IL-10 i TGF-β, protucitokini, protuendotoksini) i unutar stanične (antioksidantni sustavi, aktiviranje programirane smrti stanice), te tkivne (promjene tkivne građe).

Funkcija samog imunosnog sustava je prepoznavanje patogenog uzročnika putem urođenog imunosnog sustava, a ukoliko on nije dovoljno efikasan dolazi do pobude i specifičnog imunosnog sustava. Kada ne dođe do otklanjanja uzročnika dolazi do takozvane kronične imunosne rekacije koja zapravo označava neuspješnost imunosnog sustava.

1.4. Transplantacijska imunologija

Transplantacijskom medicinom stvorena je okolnost u kojoj se imunosni sustav nalazi u situaciji koja je nepoznata u prirodnim okolnostima, budući je imunosni sustav predisponiran za odgovor protiv aloantigena i njihovo uništavanje. U ovome trenutku u transplatacijskoj imunologiji prisutna je tendencija u kojoj se nastoji imunosni sustav dovesti u situaciju tolerancije prema aloantigenima. Sadašnja terapijska djelovanja usmjerna su prije svega na primatelja presatka i potiskivanja njegovog imunosnog odgovora (50). Za sada ne postoje mehanizmi kojima bi se proveli eventualni prijetransplatacijski terapijski postupci usmjereni na donora s ciljem smanjenja njegove imunogeničnosti. Imunosni odgovor nakon transplatacije prolazi nekoliko faza. U prvoj fazi imunosni sustav domaćina prepoznaje aloantigen, zatim slijedi faza aktivacije limfocita, te konačno njihovo djelovanje na aloantigen u cilju odbacivanja presatka.

Dva su načina na koje domaćin prepoznaje tuđe antialogene. U izravnom načinu, davateljeve stanice koje predočuju aloantigen imunosnom sustavu domaćina ograničen je životnim vijekom tih stanica. Kod neizravnog prepoznavanja antigen predočuju primateljeve dendritične stanice. U to su uključene i ključnu ulogu imaju HLA II razreda. Križnom reakcijom receptori na limfocitima T (TCR od engl. T cell receptor) prepoznaju strane HLA antigene. U daljnjem tijeku slijedi aktivacija limfocita s njihovom diferencijacijom i proliferacijom. Za potpuni proces prepoznavanja i aktivacije potreban je i „drugi signal“ u koji su uključene kostimulacijske molekule na antigen predočnim stanicama. Ciljni antigeni prema kojima je usmjerena imunosna reakcija su HLA I i II, te minorni HLA koji nekada mogu dovesti do reakcije akutnog ili kroničnog odbacivanja i kada su primatelj i davatelj podudarni u HLA I i HLA II razredu. Signali koji nastaju preko TCR kompleksa rezultira lučenjem IL-2, odnosno posljedično stimuliranom limfocitnom proliferecijom. U ovoj reakciji oslobođeni citokini vežu se na ciljne stanice koje reguliraju imunosni odgovor. Samu izvršnu funkciju u odbacivanju imaju citotoksični limfociti CD8+ i NK stanice (od engl. natural killer) (51,52).

Uz pomoć kostimulacijskih molekula koje se nalaze na površini imunopredočnih stanica, te lučenjem citokina potiće se aloreaktivnost kod ishemijsko-perfuzijskih ozljeda

presatka. Izražaj kostimulacijskih molekula i citokina na imunopredočnim stanicama potiču receptori slični Toll-u koji su predmet ovog istraživanja.

Za akutno odbacivanje važnije je izravno dok kod kroničnog neizravno prepoznavanje. Kod HLA identičnih davatelja također je potrebna imunosupresivna terapija što govori u prilog tome da je reakcija odbacivanja usmjerena i prema takozvanim minornim antigenima presatka. Oni su peptidi koji nisu dijelovi glavnog sustava tkivne snošljivosti i javlja se kod primatelja koji su podudarni s davateljem u HL-A, B i DR. Smatra se da reakciju započinju CD4+ LT i ona može u krenuti u Th1 ili Th2 smijeru koji je nama poželjniji. Th1 aktivira staničnu imunost i u njoj posreduju dominantno citokini IL-2, IFN-γ i TNF-α, a u Th2 humoralnu imunost podržavaju citokini IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13. Oba ova procesa dovode do odbacivanja presatka bilo kao akutna reakcija ili kronični događaj. U oba slučaja potrebna je medikamentozna intervencija budući je ugrožena bubrežna funkcija. Svi imunosupresijski postupci u ranom posttransplantacijskom periodu ne mogu dovesti do razvoja prirodne aktivne tolerancije. Blokadom IL-2 dolazi do spriječavanja delecije aloreaktivnil LT aktiviranjem inducirane stanične smrti. Ovo je bio razlog i za pokušaj uvođenja različitih poštednih postupaka koji su uključivali početno smanjivanjenog davanja doza imunosupresiva ili njihovo odgođenog uvođenja. Na pojedinim životinjskim modelima, ovo je imalo za posljedicu produljenja preživljevanja bubrežnog alografta vjerojatnim povećanjem i razvojem imunoregulacijskih stanica.

1.5. Imunosupresivno liječenje

Imunosupresivno liječenje za cilj ima smanjenje imunosnog odgovora primatelja i djeluju na različitim razinama aktivacije i proliferacije limfocita, a mogu imati aditivni i sinergijski učinak. Nažalost, primjenom imunosupresiva mogu se javiti i mnogobrojne komplikacije kao što su moguće infekcije, metabolički poremećaji, arterijska hipertenzija, tumori ili druge nuspojave. Zbog različitih mehanizama djelovanja danas se rutinski primjenjuju kombinacije imunosupresivnih lijekova (53).

1.5.1. Kortikosteroidi

Kortikosteroidi su bili prvi lijekovi koji su korišteni u liječenju transplantacijske reakcije nakon transplantacije. Oni djeluju na specifičnu i nespecifičnu imunost. Djelovanje na specifičnu imunost očituje se u blokadi ekspresije gena za citokine i njihove receptore koji posreduju u funkcijama limfocita T i antigen predočnih stanica. Njihovo protuupalno djelovanje ima utjecaj na nespecifičnu imunost. Smanjenjem lučenja IL-1,IL-2, IL-3, IL-6, TNF-α i INF-γ inhibiraju se svi stupnjevi aktivacije limfocita T. Kroz blokadu sinteze i djelovanjem različitih kemokina ometena je migracija monocita u upalno promjenjeno područje. U terapiji najčešće se koristi prednizolon u obliku tableta ili metilprednizolon kao intravenozni pripravak. Prednizolon je i najaktivniji kortikosteroid kratkog i srednje dugog djelovanja. Njihov poluživot traje nekoliko sati, uz suzbijenje proizvodnje limfokina na 24 sata. Budući glukokortikoidne receptore i citoplazmi ima većina stanica mogu se na brojnim organskim sustavima javiti neželjeni učinci hormonalnog, protuupalnog i imunosupresivnog djelovanja kortikosteroida. Među najvažnijima su smanjena otpornost na infekcije, arterijska hipertenzija, intolerancija glukoze, hiperlipidemija, usporeno cijeljenje rana, ometanje rasta, različite kozmetske i psihogene reakcije. S obzirom na različitu individualnu zastupljenost glukokortikoidnih receptora javljaju se i različiti odgovori domaćina. Iste se smanjuju uz niže doze kortikosteroida, tako da se danas nastoji izbjeći ili smanjiti dozu kortikosteroida, odnosno ranje obustaviti njihovu primjenu.

1.5.2. Inhibitori kalcineurina

Inhibitori kalcineurina djeluju tako da inhibiraju kalcineurinski put prijenosa signala u stanici, odnosno smanjenjem aktivacije limfocita i proizvodnje citokina. Postoje dva inhibitora kalcineurina. Ciklosporin - ciklički polipeptid gljivičnog podrijetla i takrolimus - makrolidna antibiotska tvar koja je izolirana iz Streptomyces tsukubaensis. Oba djeluju na smanjenje izražaja nekoliko citokinskih gena koji su značajni u aktivaciji limfocita T, a uključuju i gene za IL-2, IL-4 IFN-γ i TNF-α. Ciklosporin pojačava i izražaj za TGF-β (od engl. transforming growth factor-beta) koji dodatno inhibira lučenje IL-2 i citotoksičnih limfocita T. Ovi lijekovi mogu se primjenjivati peroralno ili intravenski. Poluvrijeme eliminacije inhibitora kalcineurina je oko 8 sati, metaboliziraju se u jetri a izlučuju putem žući i manje preko bubrega. U terapijskim razinama smanjuju aktivnost kalcineurina za 50%. U

praksi je potrebno određivanje razine inhibitora kalcineurina u krvi 12 sati nakon uzimanja, a kod ciklosporina 2 sata nakon uzimanja lijeka. Glavni nedostatak ovog lijeka je njegova nefrotoksičnost koja se očituje u reverzibilnoj vazokonstrikciji na aferentnoj arterioli bubrega. Dugotrajna primjena ovog lijeka može dovesti do kronične intersticijske fibroze i konačno do kroničnog progresivnog bubrežnog zatajenja.

1.5.3. Antiproliferativni lijekovi

U antiproliferativne lijekove ubrajamo mikofenolat mofetil (MMF) i azatioprin.
MMF je u uporabi od 1995. i nastao je kao proizvod fermentacije različitih plijesni vrste Penicilliuma i selektivno djeluje na limfocite. Aktivnu tvar čine mikofenolna kiselina koja inhibira sintezu purina i stvaranje gvanozin nukleotida od inozina odnosno blokira proliferaciju limfocita T u IL 2 ovisnom putu. Najčešće se koristi u kombinaciji s ciklosporinom i prednizonom peroralno. Poluvrijeme eliminacije je 12 sati, a najčešće nuspojave javljaju se prvenstveno u probavnom sustavu, zatim moguć je nastanak leukopenije, anemije i trombocitopenije. Potrebno je u kliničkoj praksi tijekom primjene određivanje koncentracije lijeka u krvi.
Azatriopin se u imunosupresivnom liječenju uglavnom dodavao ciklosporinu i kortikosteroidima. Njegovo djelovanje očutuje se ugradnjom u staničnu DNA i inhibicijom sinteze purinskih nukleotida, čime se inhibira replikacija gena s posljedičnom aktivacijom limfocita T. Njegova karakteristika je snažno inhibiranje primarnog imunosnog odgovora, dok nije učinkovit u liječenju krize odbacivanja. Neželjene nuspojave najčešće su vezane za hematološke poremećaje koje uključuju leukopeniju i trombocitopeniju, kolestazu i hepatitis.

1.5.4. TOR inhibitori

Sirolimus (rapamicin) makrolidni je antibiotik koji je u kliničku praksu uveden 1999. godine i primjenjuje se u kombinaciji s ciklosporinom i kortikosteroidima. Djelovanje se očituje u inhibiciji bjelančevine TOR (od engl. target of rapamycin) koja čini ključnu kinazu u procesu stanične diobe, odnosno sprječava učinak faktora rasta na aktivirane limfocite. U konačnici oni mogu usporiti pogoršanje djelomićno oštećene funkcije presatka. Poluživot mu

je prosječno 62 sata, resorbira se u probavnom traktu, a razgrađuju uglavnom u jetri. Svojim toksičnim učinkom na bubrežne tubule mogu dovesti do hipokalijemije i hipomagnezijemije. Drugi neželjeni učinci očituju se u usporenom cijeljenju rana, ulceracijama, oligospermijom, pojavom limfikela.

1.6. TLR receptori (TLR, od engl. Toll-like receptors)

Toll receptor otkriven je u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) sredinom osamdesetih godina prošlog stoljeća. Za ovo otkriće zanstvenici Christiane Nusslein-Volhard i Eric Wieschaus dobili su Nobelovu nagradu iz fiziologije i medicine 1995. godine. Sam naziv dobili su prema njemačkoj riječi "toll", što u prijevodu znači "izvanredno". Ovo otkriće dovelo je u daljnjim istraživanjima i do novih spoznaja zbog kojih je dodijeljena još jedna Nobelova nagrada 2011. godine. Dobili su je Bruce A. Beutler i Jules A. Hoffmann za svoje otkriće da receptori slični Toll-u prepoznaju velik broj mikroorganizama i aktiviraju prirođeni imunološki odgovor (54).

Današnje spoznaje govore u prilog tome da skupina Toll-like receptora (TLR) ima jednu od ključnih uloga u evolucijskom razvoju prirođenih obrambenih mehanizmima organizma, te u stečenom imunološkom odgovoru. Obitelj TLR čine evolucijski očuvani transmembanski proteini čija je zadaća domaćinu omogućiti prepoznavanje različitih molekularnih sljedova bakterijskog i virusnog podrijetla.

Do sada je otkriveno postojanje trinaest vrsta TLR receptora koji su identificirani kod miševa i ljudi. One su obilježene brojevima od 1 do 13. TLR 1-9 identificirani i kod ljudi i miševa, a TLR10 je identificiran samo u miševa, dok je TLR11 samo u ljudi. Različiti članovi obitelji TLR-a imaju različitu ulogu u obrani organizma od patogena.

Obitelj TLR-a prepoznata je kao ključna komponenta u mehanizmima upalnih reakcija kod sisavaca uzrokovanih mikroorganizmima. Predstavljaju prvu liniju antimikrobne obrane tako što aktiviraju prirođenu imunosti, a lokalizirani su uglavnom na stanicama imunološkog sustava, ali mogu se također naći i na drugim stanicama. To je skupina receptora koji domaćinu omogućuju prepoznavanje velikog broja patogenima pridruženih molekularnih

sljedova (PAMP, engl. *pathogen associated molecular patterns*) kao što je bakterijski flagelin, polipeptidi, glikoproteini, virusna RNA, DNA i razni drugi. TLR također mogu prepoznati i niz liganada domaćina koji nastaju razaranjem različitih vrsta stanica u upalnim i stres reakcijama tzv. molekule DAMP (DAMP, skraćeno od engl. *damage associated molecular patterns*) (55).

Razlikuju se upravo po toj specifičnosti prema ligandu (Tablica 1.1.)

Tablica 1.1. TLR-i, njihovi ligandi i podrijetlo liganda

TLR	ligandi	podrijetlo liganda
TLR 1	triacil lipopeptid	bakterije i mikobakterije
	topivi čimbenici	Neisseria meningitidis
TLR 2	lipoprotein/lipopeptidi	brojni patogeni
	peptidoglikan (PGN)	Gram-pozitivne bakterije
	lipoteihoična kiselina	Gram-pozitivne bakterije
	lipoarabinomanan	Mikobakterije
	fenol-solubilni modulin	Staphylococcus epidermidis
	glikolipidi	Treponema maltophilum
	porini	Neisseria
	zimosan	gljive
	Hsp 70 (Heat shock protein)	domaćin
	HCV-jezgra,	HCV
	nestrukturalni protein	HCV
TLR 3	dvolančana RNA	virusi
TLR 4	lipopolisaharidi (LPS)	Gram-negativne bakterije
	taksol	biljke
	fuzijski protein	respiratorni sincicijski virus (RSV)
	Hsp 60	Chlamydia pneumoniae
	Hsp 70	domaćin
	Oligosaharidi hijaluronske kiseline	domaćin
	fibrinogen	domaćin
	proteini virusne ovojnice	virusi
TLR 5	flagelin	bakterije
TLR 6	diacil lipopeptidi	mikoplazme
	lipoteihoična kiselina	Gram-pozitivne bakterije
	zimosan	gljive
TLR 7	imidazokinolini	sintetički spojevi
	loksoribini	sintetički spojevi
	bropirimini	sintetički spojevi
	jednolančana RNA	virusi
TLR 8	imidazokinolini	sintetički spojevi
	jednolančana RNA	virusi
TLR 9	oligodeoksinukleotidi(CpG ODN)	bakterije i virusi
TLR 10	nepoznato	nepoznato

Nakon samog vezivanja liganda i TLR-a dolazi do aktivacije signalnih puteva koji mogu rezultirati odgovorom imunosnog sustava u cilju eliminacije patogena. TLR potiću i samo sazrijevanje dendritičnih stanica koje su odgovorne za započinjanje specifičnog imunološkog odgovora kroz predočavanje antigena. S druge strane nekontrolirana aktivacija TLR-a može imati i negativne posljedice. One se mogu primjerice povezati s patogenezom autoimunih, kroničnih upalnih ili različitih infektivnih bolesti. Zanimljiv primjer negativnog utjecaja TLR-a je u razvoju ateroskleroze, a postoje naznake da TLR sudjeluju u patogenezi šećerne bolesti, progresiji kroničnih upalnih bolesti kao što su astma, kronične opstruktivne plućne bolesti, reumatoidni artritis.

Osim što TLR vežu ligande patogena, oni se također reagiraju s molekulama domaćina (ove molekule se u literaturi označavaju kao alarmini), uključujući i različite antimikrobne molekule, te proteine koji se oslobađaju iz mrtvih ili umirućih stanica kao što su HMGB1 (HMGB1 od engl. *high mobility group box-1*), protein surfaktanta A, razgradne produkte ekstracelularnog matriksa poput fragmenta fibronektina. Proteini toplinskog šoka (heat shock proteini - Hsp) poput Hsp60, Hsp70, Hsp90 (gp90) aktiviraju tlr2 i tlr4, te potiču stvaranje proupalnih citokina monocita i makrofaga i sazrijevanje dendritičkih stanica. Postoji također i niz nepoznanica u definiranju točnog podrijetla i prirode TLR liganada domaćina i njihove interakcije s TLR-om. Tako na primjer postoje dokazi koji ukazuju da bi učinci proteina toplinskog šoka na lučenje citokina mogli biti posljedica kontaminacije LPS-om. Još nije potpuno razjašnjeno kako brojni agonisti stimuliraju jedan TLR, odnosno kako jedan agonist se može interagirati s više različitih TLR-a.

1.7. Građa Toll-like receptora

TLR-i i obitelj interleukin-1 receptora (IL-1R) imaju vrlo sličnu citoplazmatsku domenu koja se naziva TIR domena. TIR domena građena je od 5 petlji, 5 β-nabranih ploča i 5 α- zavojnica kojima su međusobno povezani u strukturu građenu od tri podjedinice: Box1-3. Podjedinica Box1 je ista kod svih TLR-a, a podjedinica Box2 sadrži tzv. BB-petlju koja je nužna u prijenosu signala. U njoj se nalazi konzervirani slijed aa koji sadrži prolin. Zamjena prolina histidinom ima za posljedicu prekid prijenosa signala i ona nastaje kod mutacija u genu *tlr4*.

Podjedinica Box3 također je nužna za funkciju TLR-a, sadrži određene aa koje imaju važnu ulogu u prijenosu signala (56).

TLR-i i IL-1R razlikuju se po građi izvanstanične domene. Receptor IL-1R sadrži imunoglobulinu sličnu domenu (Ig-like domain), a osnovna građevna jedinica izvanstaničnog dijela TLR-a je proteinski slijed građen od 19 do 25 leucinom bogatih ponavljajućih slijedova (LRR, engl. *leucine-rich repeats*). Svaka podjedinica LRR građena je od 24-29 aa i sadrži leucinom bogat slijed i konzervirani slijed bogat hidrofobnim aa.
LRR imaju potkovičastu strukturu koja i omogućuje prepoznavanje širokog spektra liganada.

1.8. Polimorfizmi unutar gena za Toll-like receptore

Polimorfizam odnosno raznolikost genoma čovjeka omogućuje razlikovanje jedinki. Ono može biti i osnova za pronalaženje gena odgovornih za nastanak različitih nasljednih bolesti. Različiti oblici istoga gena nazivaju se genske varijante ili aleli. Na kromosomu može se naći nekoliko tisuća gena, a njegov položaj naziva se lokus. Promjenom strukture genomske DNA koja se odnosi na pojavu više od jednoga alela na istome lokusu naziva se genski polimorfizam. On se uočava više od 1% ukupne populacije. Mutacija je proces u kojemu se remeti redoslijed nukleotida, a samim tim i strukture proteina. Genske mutacije kod kojih dolazi do promjene jednog nukleotida, takozvane točkaste mutacije dovode do promjena jednog gena stvarajući nove alelne oblike. Osim ovakovih vrsta mutacija uzroci polimorfizma mogu biti umetanje ili insercija, ispadanje ili delecija nukleotida (57). Ovo za posljedicu ima pogrešno sparivanje baza zbog iskliznuća dijela slijeda ili izmjena sestrinski kromatida. Polimorfizam jednog nukleotida odnosno polimorfizam u kojem je nukleotid (A,TE,G ili C) zamjenjen drugim uzrokuju promjenu u slijedu DNA. Unutar gena tlr-4 opisano je 35 polimorfizama.

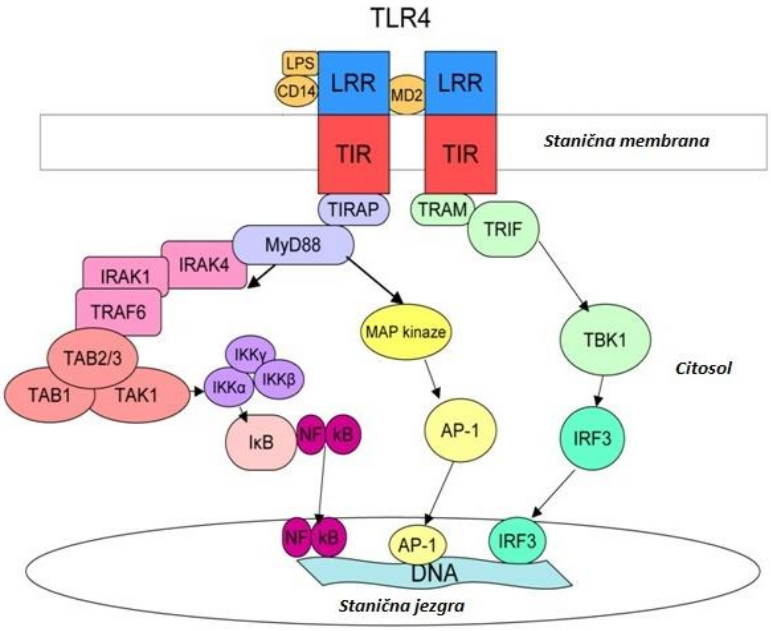
1.9. Signalizacija putem Toll like raceptora

Dok većina TLR-a funkcionira kao homodimeri, za TLR2 karakteristično je da čine heterodimere s TLR1 i TLR6. Po vezivanju aktivacijskog liganda na TLR-u dolazi do njegove

dimerizacije i posljedično tome aktivacije unutarstaničnog signalnog puta. Četiri adaptorske molkule koje imaju za TIR domenu TLR-a specifičan C terminalni dio sudjeluju u prijenosu signala. Te molekule su MyD88, TIRAP (Mal), TRIF (TICAM-1) i TRAM (58,59,60). One se nakon dimerizacije vežu za TIR domenu, te pokreću ostale signalne molekule unutar stanice. Postoj dva osnovna puta pobude TLR-a. Svim TLR-ima, osim TLR3 zajednički je put pomoću MyD88. On dovodi do nastanka proupalnih citokina i kemokina, dok drugi put pobude koji je MyD88-neovisan karakteriziran je nastankom IFβ.

Kod MyD-88 ovisnog puta, adaptorska molekula uz pomoć TIRAP-a veže se za TIR domenu TLR-a, pobuđuje IRAK4 kinazu koja u daljnjem tijeku fosforilira kinazu IRAK1. Vezivanjem za molekulu TRAF6 dolazi do pobude dva različita signalna puta. U prvom kompleks koji čine IRAK1-IRAK4-IRAK6 pobuđuje daljnji kompleks TAK1-TAB1-TAB2/3. U ovom procesu TAK1 je ključna molekula aktivirana od TAB1. Udaljnjem tijeku TAK1 pobuđuje IKK kompleks koji se sastoji od 3 kinaze koje sudjeluju u fosforiliranju IκB bjelančvine. Ovim procesom dolazi do odvajanja NFκB koja se tada aktivira i inducira izražaj gena upalnih citokina. U drugom putu dolazi do aktivacije MAP kinaze s pobudom AP-1 transkripcijskog čimbenika (61).

Kod MyD88-neovisnog puta kompleks TRIF-TRAM pobuđuje TBK1 što uzrokuje transkripciju i fosforilaciju IRF3 koja dovodi do produkcij IFβ i kostimulacijskih molekula. Potrbene su i dodatne kostimulacijske molekule da bi se ligandi vezali za TLR. Tako su CD14 i LBP potrebni da bi se tlr4 pobudio putem LPS. On se sastoji od varijabilnog hidrofilnog polisaharida i hidrofobne domene koju nazivamo lipid A. Isti je evolucijski vrlo konzerviran, a odgovoran je za biološku aktivnost LPS na koju se upravo veže TLR4. LPS se veže na LBP i zajedno s CD14 ostvaruje signal u stanici. MD-2 dovodi do dovodi do homologne dimerizacije TLR4. (Slika 1.1.)



Slika 1.1. Shematski prikaz modela signalizacije putem TLR4

AP-1 (pobuđeni protein, od engl. *activated protein 1*); **CD14** (razlikovna skupina 14, od engl. *cluster of differentiation 14*); **DNA** (deoksiribonukleinska kiselina, od engl. deoxiribonucleid acid); **IkB** (inhibitor NFkB); **IKK α,β,γ** (IkB kinaza α,β,γ); **IRAK-1** (kinaza vezana uz IL-1 receptor, od engl. *IL-1 receptor-associated kinase*); **IRF3** (interferon regulacijski čimbenik 3, od engl. *interferon regulatory factor 3)*; **LPS** (lipoplisaharid); **LRR** (leucinom bogata regija, od engl. *leucine reach region)*; **MAP kinaza** (protein koji pobuđuje mitogen kinazu, od engl. *mitogen activated protein kinase*); **MyD88** (protein primarno odgovoran za mijeloidno razlikovanje, od engl. *myeloid differentiation primary respone protein*); **NFκB** (jezgrin čimbenik κB, od engl. *nuclear factor κB*); **TAB** (protein koji veže TAK od engl. *TAK binding potein);* **TAK1** (transformirajući čimbenik rasta β (TGFβ) koji pobuđuje kinazu 1, od engl. *transforming growth factor β-activated kinase 1)*; **TBK1** (kinaza serin-treonin proteina, od engl. *serine-threonine protein kinase*); **TIR** (Toll/IL-1 receptor); **TRAF** (čimbenik vezan uz TNF, od engl. *tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor*); **TIRAP** (adaptorski protein koji sadrži TIR domenu, od engl. *TIR domain-containing adaptor protein*); **TRAM** (adaptorska molekula srodna TRIF-u, od engl. *TRIF-related adaptor molecule*); **TRIF** (adaptorski protein koji sadrži TIR domenu i potiče interferon β, od engl. *TIR domain-containing adaptor inducing interferon β*).

1.10 TLR i transplantacija bubrega

Prepoznavanje i uklanjanje opasnosti za organizam glavne su zadaće imunosnog sustava. Tradicionalno se prepoznavanje opasnosti u imunološkom odgovoru temeljilo na razlikovanju vlastitog i tuđeg (*self and non self discrimination*). Može se reći kako je pitanje što je opasnost za organizam daleko složenije i uključuje različite oblike opasnosti od patogenih mikroba do promijenjenih vlastitih stanica (maligne ili inficirane stanice).

Imunosni sustav mora razlikovati stvarnu mikrobnu opasnost od „prijateljskih“ komenzalnih mikroba, zatim antigena sastojaka hrane ili pak vlastitog embrija. Samim time pogrešna odluka u prepoznavanju opasnosti može dovesti do kronične infekcije, autoimunih bolesti ili gubitka ploda.

Prirođena imunost ima odlučujuću ulogu prepoznavanju opasnosti i posljedično tome daje ključne upute za aktivaciju stečene imunosti. Sukladno navedenim spoznajama čini se kako pojedini dijelovi prirođene imunosti (stanice prirođene imunosti, sustav komplementa i receptori slični Toll-u) imaju jednako važnu ulogu u reagiranju imunosnog sustava na bubrežni presadak, odnosno odbacivanje presatka ili tolerancija presatka. Razumijevanje međusobne povezanosti prirođene i stečene imunosti potrebno je kako bi se moglo *uputiti* imunosni sustav na prihvaćanje presatka kao nečeg što je strano i neopasno (*non dengerous non self*) (62). Razvitak primateljeve tolerancije na presađeni organ nedostižan je cilj transplantacijske imunologije, od kada je Bilingham toleranciju na presadak prvi puta opisao (63). Nedavna istraživanja utvrdila su kako signalizacija putem TLR sprječava razvitak tolerancije na presdak.

Tako recimo, tijekom kirurškog postupka transplantacije presađeni organ izložen je djelovanju endogenih i egzogenih čimbenika koji predstavljaju agoniste TLR. Poznato je kako kirurška trauma ili ishemija inducira oslobađanje endogenih liganada ovih receptora (hijalouronan, proteini toplinskog šoka, heparan sulfat), koje smo ranije označili kao endogene molekularne obrasce vezane uz oštećenje tkiva (DAMP) (64,65,66).

Štoviše moždana smrt inducira izražaj endogenih agonista sustava TLR, jednako tako ljudski organizam je stalno izložen egzogenim ligandima ovoga sustava (bakterijski proizvodi, označeni kao PAMP) (67).

Sukladno tome u ljudskom organizmu zapravo je neizbježna aktivacija ovog sustava i prema tome čini se kako bez blokade ovog sustava izazivanje tolerancije imunosnog sustava na presdak je gotovo nemoguće. Racionalna terapija u smislu nadzora ovog sustava koji zapravo instruira specifični imunosni sustav prema odgovoru u smislu odbacivanja presatka moguća je tek onda kada možemo u potpunosti razumjeti na koji način ovaj sustav reagira.
U prilog ovoj činjenici govore istraživanja u kojima se uporabom liganada za pojedini TLR može potaknuti snažni stanični imunosni odgovor (Th1) umjesto imunoregulacijskog ili tolerantnog odgovora (Treg) (68).

U ovom istraživanju analizirali smo potencijalne genetskih biomarkera koji se mogu povezati s funkcijom bubrežnog presatka i to analizom pojedinačnih nukleotidnih

polimorfizama u genu tlr4. Osim toga ispitana je funkcija tlr4 gena određivanjem protočnom citometrijom izražaja TLR4 na površini monocita bolesnika s presađenim bubregom. Ovakva istraživanja su na tragu istraživanja potencijalnih biomarkera odbacivanja bubrežnog presatka odnosno imunosnog praćenja bolesnika s presađenim bubregom, a sve u svrhu razumijevanja imunosnog odgovora na presadak.

2. HIPOTEZE

Aktivacija stanice koje predočuju antigen preko TLR4 putem vezivanja molekulskih strukture udruženih s patogenom (PAMP, od engl. pathogen associated molecular patterns) i endogenih struktura povezanih s ozljedom tkiva (DAMP; od engl. damage associated molecular patterns) značajna je za aktivaciju aloreaktivnih limfocita te može biti prognostički pokazatelj kroničnog odbacivanja transplantata.

Genotip za TLR4 i način imunosupresije utječu na izražaj TLR4 na perifernim monocitima i funkciju burežnog prestaka.

3. CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Odrediti povezanost specifičnog polimorfizma gena za tlr4 s kroničnom nefropatijom presatka.

Odrediti povezanost specifičnog polimorfizma gena za tlr4 na izražaj istog receptora na perifernim monocitima.

Odrediti utjecaj imunosupresije (kalcineurinski inhibitori, mikofenil mofetil, kortikosteroidi, monoklonska protutijela protiv IL2 receptora) na izražaj TLR4 receptora na perifernim mononuklearima.

Odrediti povezanost izražaja TLR4 receptora na perifernim mononuklearima s kroničnom nefropatijom presatka.

Odrediti utjecaj vremena (eventualnog razvitka tolerancije) proteklog od transplantacije na izražaj TLR4 receptora na perifernim mononuklearima.

Odrediti povezanost polimorfizma gena za tlr4 i izražaja TLR4 receptora s nastankom epizoda reakcija odbacivanja presatka, povrata osnovne bubrežne bolesti, infekcijama, srčanožilnim bolestima, šećernom bolesti i pojavom zloćudnih bolesti.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

Ustroj studije: istraživanje parova. Studija se sastoji od dvije skupine ispitanika. U prvoj skupini bolesnika su transplantirani bolesnici, a u skupini kontrola, zdrave osobe, prilagođene prema dobi i spolu.

Ukupno je uključeno 70 bolesnika s transplantiranim bubregom i 50 zdravih kontrola.
Uključujući kriteriji za bolesnike:

- dob u trenutku bubrežnog presađivanja 18 i više godina;
- bolesnici kod kojih je bubrežno presađivanje učinjeni prije najmanje 6 mjeseci od uključivanja u istraživanje, a presadak je dobiven od nežive nesrodne osobe;
- funkcionalan bubrežni presadak, *kreatininski klirens* u trenutku uključivanja u istraživanje veći od 30 ml/min.

Isključujući kriterij bila je akutna kriza odbacivanja i aktivna akutna sustavna infekcija u trenutku uzimanja krvnih uzoraka za izolaciju perifernih mononuklearnih leukocita, te nekontrolirano praćenje ili nesuradljivost bolesnika.

Postojanje kronične nefropatije presatka određeno je prema kliničkim pokazateljima veličine glomerularne filtracije (stratifikacija prema klirensu endogenog kreatinina) u redovitim laboratorijskim kontrolama nakon učinjene transplantacije i/ili na temelju patološke proteinurije. Prema svjetskim podatcima otprilike jedna četvrtina bolesnika nakon godine dana od transplantacije ima umjereni stupanj kronične nefropatije presatka, a nakon 10 godina čak i do 90% transplantiranih bolesnika. Za opažanje većih razlika uz razinu značajnosti 0,05 i snagu testa od 80% minimalno je potrebno 70 ispitanika.

Kontrole su zdrave osobe koje odgovaraju po dobi ispitanicima i koji ne uzimaju imunosupresivne lijekove ili antiupalne lijekove.
Uključujući kriteriji za bolesnike su slijedeći: presadak dobiven od nežive nesrodne osobe; funkcionalan bubrežni presadak, kreatininski klirens u trenutku uključivanja u istraživanje veći od 30 ml/min. Isključujući kriterij je akutna kriza odbacivanja i aktivna sustavna infekcija u trenutku uzimanja krvnih uzoraka za izolaciju perifernih mononuklearnih leukocita, te nekontrolirano praćenje ili nesuradljivost bolesnika.

4.1. DNA analiza

Svim ispitanicima (skupina bolesnika i kontrolna skupina) izolirali smo DNA iz pune krvi koja je uzeta venepunkcijom u EDTA-epruvete (uz etilendiaminotetraoctenu kiselinu, EDTA kao antikoagulans) testom za izolaciju ukupne genomske DNA, *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche). Detekcija polimorfizama gena tlr4 rs4986790 (A896G,D299G) i tlr4 rs4986791 (C1196T,T399I) učinjena je pomoću real-time PCR-a na uređaju *LightCycler* (verzija 1.5) prema uvjetima i preporukama proizvođača početnica i proba, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Njemačka (68).

Izražaj TLR4 na perifernim monocitima određen je metodom protočne citometrije (dvostruko bojanje na tlr4 i CD14, prema uputama proizvođača BD Pharmingen, SAD).

4.2. Standardna biokemijska analiza

Ispitanicima je u trenutku određivanja razine tlr4 protočnom citometrijom u sklopu redovite laboratorijske kontrole, određena: kompletna krvna slike, C-reaktivni protein, ureja, kreatinin, urati, glukoza u krvi, biokemijske analize urina te određivanje razine imunosupresivnih lijekova (ciklosporin, tacrolimus, sirolimus) .

Iz medicinske dokumentacije (povijest bolesti) uzeti osnovna obilježja bolesnika:
uzrok bubrežnog zatajenja, dob, spol, tjelesna težina, tjelesna visina, vrijeme provedeno na dijalizi, vrijeme proteklo od transplantacije, broj epizoda odbacivanja presatka, HLA podudarnost, senzibilizacija).
Komorbiditeti: srčanožilne bolesti, arterijska hipertenzija, šećerna bolest, zloćudne bolesti, debljina, infekcije i povrat osnove bubrežne bolesti.
Laboratorijski podatci o funkciji bubrežnog presatka (klirens endogenog kreatinina izračunat prema Cockcroft-Gaultova jednadžbi, proteinurija).
Indukcijska imunsupresijska terapija (uporaba protutijela daklizumab i basiliksimab) u tijeku transplantacijskog postupka te kasnija imunosupresijska terapija (doza: krtikosteroida, ciklosporina, takrolimusa, mikofenolne kiseline i m-TOR inhibitora)
podaci o kirurškom zahvatu.

4.3. Obrada podataka i statistička analiza:

Brojčani podaci opisani su osnovnim mjerama sredine i raspršenja. Normalnost raspodjele promatranih numeričkih varijabli testirani su Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Kategoričke varijable opisane su apsolutnim i relativnim frekvencijama.
S obzirom na normalnost raspodjele primijenjen je parametrijski ili neparametrijski test. Razlike među kategoričkim varijablama testirane su χ^2 testom ili Fisher-ovim egzaktnim testom.

Za istraživanje razlika dvaju nezavisnih parametara upotrijebljen je T-test (u slučaju normalne razdiobe) ili Mann-Whitney test; za usporedbu više od dviju nezavisnih skupina unutar pojedinog mjerenja upotrijebljen je ANOVA ili Kruskal-Wallis test, ovisno o normalnosti raspodjele.

Statistička snaga alelnog testa povezanosti polimorfizma izračunata je Genetic Power Calculator programom (http:/pngu.mgh.harvard.edu/ purcell/gpc/cc2.html). Testiranje Hardy-Weinberg ekvilibrija genotipskih frekvencija (χ^2 test df=1)
Od multivarijatnih metoda upotrjebljena je logistička regresija koja se često koristi za analiziranje multivarijatnih podataka koji sadrže binarne podatke. Ova je metoda upotrjebljena za ispitivanje značajnosti utjecaja varijabli na zavisnu varijablu kao i za procjenu vjerojatnosti da će osoba razviti šećernu bolest.

Statistička obrada napravljena je uz upotrebu programskog paketa SAS 9.1.

4.4. Protokol istraživanja

Probir bolesnika - učinit će se u ambulanti Odjela za dijalizu Klinike za unutarnje bolesti KBC Osijek, gdje su ispitanici dobiti usmeno osnovne informacije o ispitivanju, te im je uručen i primjerak Dokumenta obaviještenosti kako bi imali dovoljno vremena da ga prouće.

Prva posjeta - na koju je bolesnik dolazi u jutarnjim satima, natašte, učinjena je tijekom redovitih ambulantnih kontrola transplantiranih bolesnika. Tijekom iste, nakon što je ispitaniku odgovoreno na sva eventualna pitanja, te nakon što je dao pismeni pristanak za sudjelovanje u ispitivanju, učinjeno je slijedeće:

Tijekom prve posjete uzeta su dva uzorka periferne krvi za DNA tipizaciju i za tipizaciju perifernih mononukleara i određivanje protočnom citometrijom izražaj tlr4 receptora (ukupno 6 ml krvi). Osim navedenih uzoraka krvi uzeti su i uzorci krvi za rutinsku laboratorijsku kontrolu. Rutinska laboratorijska kontrola uključuje određivanje: kompletne krvne slike, C-reaktivnog proteina, ureje, kreatinina, urata, glukoze u krvi, biokemijske analize urina te određivanje razine imunosupresivnih lijekova (npr. ciklosporin, tacrolimus, sirolimus). Iz postojeće medicinske dokumentacije prikupljni su svi relevantni anamnestički podaci s naglaskom na HLA tipizaciju primatelja i davatelja bubrega, demografske podatke, obiteljsku anamnezu, dijagnozu bolesti, podatke o razvitku kroničnih komplikacija, popratnim bolestima, lijekovi koje koristi s posebnim naglaskom na imunosupresijsku terapiju te dostupni podatci o tijeku kirurškog zahvata (trajanje hladne ishemije, odgođena funkcija bubrežnog presatka).

5. REZULTATI

5.1. Osnovna obilježja ispitanika s presađenim bubregom

Istraživanjem je obuhvaćena ukupno 120 ispitanika, od čega je 50 (41,7%) ispitanika kontrolne skupine i 70 (58,3%) bolesnika s presađenim bubregom. U 47 (62,7%) ispitanika bubrežno presađivanje je izvedeno u Kliničkom bolničkom centru Osijek, a 28 (37,3%) u Zagrebu (Klinički bolnički centar Zagreb ili Klinički bolnica Merkur).

Značajno više ispitanika je muškog spola u skupini ispitanika s bubrežnim presatkom (Fisherov egzaktni test, p=0,002) (Tablica 5.1.).

Tablica 5.1. Ispitanici po spolu

Spol	Broj (%) ispitanika			p*
	Kontrolna skupina	Transplantirani	Ukupno	
muškarci	13 (26)	40 (57,1)	53 (44,2)	0,001
žene	37 (74)	30 (42,9)	67 (55,8)	
ukupno	50 (100)	70 (100)	120 (100)	

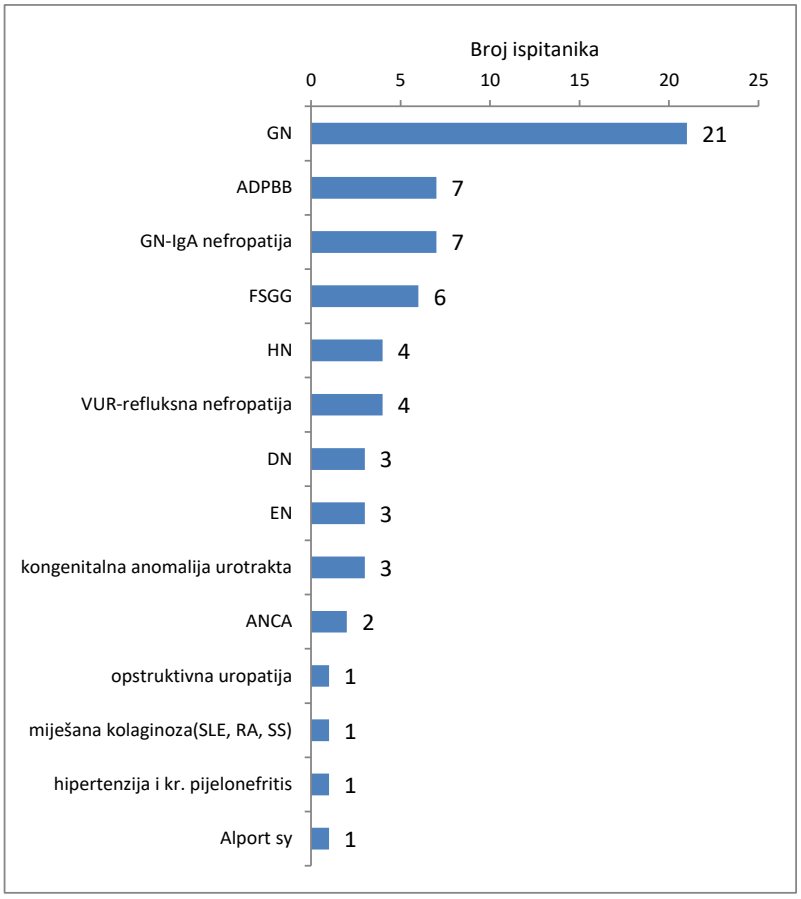
*Fisherov egzaktni test

Osnovne mjere sredine i raspršenja dobi i parametara vezanih uz ispitanike s presađenim bubregom prikazani su u Tablici 5.2.

Tablica 5.2. Osobitosti ispitanika s presađenim bubregom (n=70)

Parametri	Medijan (25% - 75%)
Aktualna dob (godine)	53 (45 – 58)
Dob u trenutku transplantacije (godine)	51 (43 – 55)
Dob u trenutku započinjanja liječenja dijalizom (godine)	46 (37 – 51)
Vrijeme provedeno na nadomjesnoj bubrežnoj terapiji (godine)	4 (2 – 6)
Vrijeme od transplantacije (godine)	3 (2 – 5)
Klirens kreatitina u trenutku uključivanja u studiju (RV: 75-124 ml/min)	68 (51,2 – 84,3)
Broj HLA nepodudarnosti 0-1	8 (11,4)
Broj HLA nepodudarnosti 2-4	57 (81,4)
Broj HLA nepodudarnosti 5-6	5 (7,1)

Najčešća dijagnoza kronične bubrežne bolesti je kronični biopsijom nepotvrđeni glomerulonefritis kod 21 (32,8%) ispitanika, zatim autosomno dominatna policistična bolest bubrega kod 7 (10,9%) ispitanika. Biopsijom je potvrđena dijagnoza fokalne glomerularne skleroze kod 6 (9,4%) a IgA nefropatije je kod 7 (7,8%) ispitanika. Hipertenzivnu nefroptaiju je imalo 4 (6,3%), a jednaki broj je imao i refluksnu nefropatiju, dok su ostale dijagnoze zastupljene s manjim brojem ispitanika (Slika 5.1.).



Slika 5.1. Ispitanici s presađenim bubregom i uzroci kronične bubrežne bolesti (n=70)
(DN: skraćeno od dijabetička nefropatija; HN: skraćeno od hipertenzivna nefropatija; ADPBB: skraćeno od autosomno dominanatna policistična bolest bubrega; EN: skraćeno od endemska nefropatija; FSGS: skraćeno od fokalna segmentalna glomeruloskleroza)

5.2. Osnovna obilježja darivatelja bubrega

Od ukupno 45 darivatelja organa, za koje posjedujemo podatke, 28 (62,2%) je muškaraca i 17 (37,8%) žena. Najviše darivatelja nema u anamnezi komorbidnih stanja (45,5%), dok je hipertenzija zastupljena u 23 (51,1%) donora. S obzirom na navike, alkohol je uzimalo 7 (15,5%), a pušilo 5 (11,1%) donora. Srednja dob donora je 52 godine (interkvartilnog raspona 40 – 62).

Značajno niža vrijednost serumskog kreatinina je izmjerena u donora ženskog spola (Mann Whitney test, p=0,003) (Tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Srednje vrijednosti metabolita dušika u krvi darivatelja

Parametri donora	Medijan (25% - 75%)*			p†
	Muškarci	Žene	Ukupno	
dob	52 (39 – 60)	54 (42 – 70)	52 (40 – 62)	0,221
urea mmol/l (1-8,3)	7,3 (4,1 – 8,3)	5,1 (3,9 – 6,4)	5,8 (4,2 – 8,2)	0,200
Kreatinin μmol/l (42-97)	93 (75,5 – 120)	63 (44,7 – 80)	84 (61 – 112)	0,003

*Interkvartilni raspon;†Mann Whitney test

Prije bubrežnog presađivanja ispitanicima i davateljima bubrega određeni antigeni tkivne snošljivosti (HLA aleli). U tablici 5.4. prikazani su najčešći HLA aleli primatelja i darivatelja na A, B i DR lokusima.

Tablica 5.4. Zastupljenost HLA alela kod donora i primatelja Najučestaliji HLA aleli prikazani u tablici posebno su označeni.

HLA fenotip - donor (n=45)						HLA fenotip - primatelj (n=70)					
A	N(%)	B	N(%)	DR	N(%)	A	N(%)	B	N(%)	DR	N(%)
1	20 (26,7)	5	15 (20)	1	13 (17,3)	1	23 (30,7)	5	3 (4)	1	19 (25,3)
2	38 (50,7)	7	8 (10,7)	2	8 (10,7)	2	35 (46,7)	7	5 (6,7)	2	1 (1,3)
3	16 (21,3)	8	13 (17,3)	3	15 (20)	3	16 (21,3)	8	16 (21,3)	3	22 (29,3)
9	12 (16)	12	10 (13,3)	4	14 (18,7)	9	1 (1,3)	12	3 (4)	4	14 (18,7)
10	5 (6,7)	13	5 (6,7)	5	16 (21,3)	11	10 (13,3)	13	4 (5,3)	7	12 (16)
11	11 (14,7)	14	3 (4)	6	12 (16)	23	2 (2,7)	14	6 (8)	8	5 (6,7)
15	0	15	4 (5,3)	7	17 (22,7)	24	10 (13,3)	17	1 (1,3)	10	3 (4)
17	0	16	4 (5,3)	8	4 (5,3)	25	2 (2,7)	18	9 (12)	11	20 (26,7)
19	8 (10,7)	17	5 (6,7)	10	1 (1,3)	26	10 (13,3)	27	7 (9,3)	12	4 (5,3)
21	0	18	10 (13,3)	11	23 (30,7)	28	4 (5,3)	35	15 (20)	13	10 (13,3)
23	3 (4)	21	4 (5,3)	12	1 (1,3)	29	2 (2,7)	37	2 (2,7)	14	4 (5,3)
24	15 (20)	22	4 (5,3)	13	15 (20)	30	1 (1,3)	38	5 (6,7)	15	14 (18,7)
25	5 (6,7)	27	5 (6,7)	14	4 (5,3)	31	2 (2,7)	39	5 (6,7)	16	11 (14,7)
26	3 (4)	35	11 (14,7)	15	16 (21,3)	32	6 (8)	41	3 (4)		
28	2 (2,7)	37	2 (2,7)	16	14 (18,7)	33	7 (9,3)	44	9 (12)		
29	2 (2,7)	38	6 (8)	17	1 (1,3)	66	1 (1,3)	49	2 (2,7)		
30	3 (4)	39	5 (6,7)	51	8 (10,7)	68	6 (8)	520	2 (2,7)		
31	8 (10,7)	40	3 (4)	52	27 (36)			51	18 (24)		
32	3 (4)	41	2 (2,7)	53	15 (20)			52	4 (5,3)		
33	2 (2,7)	44	14 (18,7)					53	1 (1,3)		
34	1 (1,3)	49	5 (6,7)					55	2 (2,7)		
68	2 (2,7)	50	2 (2,7)					56	3 (4)		
		51	21 (28)					57	5 (6,7)		
		52	2 (2,7)					58	1 (1,3)		
		53	1 (1,3)					60	3 (4)		
		55	4 (5,3)					61	2 (2,7)		
		56	3 (4)					62	3 (4)		
		57	4 (5,3)					63	1 (1,3)		
		58	2 (2,7)					65	2 (2,7)		
		60	1 (1,3)					72	1 (1,3)		
		61	3 (4)								
		62	6 (8)								
		65	1 (1,3)								
		70	1 (1,3)								
		w6	26 (34,7)								
		w4	26 (34,7)								

5.3. Osobine darivatelja i funkcija presađenog bubrega

Ispitanici s presađenim bubregom imali su više vrijednosti klirensa kreatinina određivane u trenutku protočne citometrije ukoliko su dobile bubreg od mlađeg darivatelja (Spearman, ρ= -381, p=0,009). Nema razlika s obzirom na odbacivanje presatka i dobi ispitanika s presađenim bubregom (Mann Whitney test, p=0,301) kao ni dobi darivatelja organa (Mann Whitney test, p=0,102).

5.4. Protočna citometrija perifernih monocita

Protočnom citometrijom određen je postotak monocita i izražaj tlr4 na njima.
Značajno je manji postotak monocita (%) (Mann Whitney test, p=0,001) u kontrolnoj skupini, u odnosu na ispitanike s presađenim bubregom (Tablica 5.5.).

Tablica 5.5. Srednje vrijednosti monocita (%) po skupinama

Parametri	Medijan (25% - 75%)*			p†
	Kontrolna skupina	Transplantirani	Ukupno	
monociti (2-12%)	5,4 (4,5 – 6,8)	7,3 (5,6 – 9,3)	6,4 (5,1 – 8,9)	0,001

*Interkvartilni raspon;†Mann Whitney test

Izražaj TLR4 i CD14 na perifernim monocitima (dvostruko bojanje) značajno je viši u transplantiranih ispitanika (Mann Whitney test, p=0,004) (Mann Whitney test, p=0,031) (Tablica 5.6.).

Tablica 5.6. Izražaj TLR4 i CD14 po skupinama

Parametri	Medijan (25% - 75%)*			p*
	Kontrolna skupina	Transplantirani	Ukupno	
TLR4	99,2 (90,5 – 110,7)	107,9 (96,2 – 118,5)	104,4 (93,2 – 113,8)	0,004
CD14	97,8 (96,2 – 98,8)	98,2 (97,2 – 99,3)	98,1 (96,7 – 99,2)	0,031

*Interkvartilni raspon;†Mann Whitney test

5.5. Lijekovi koje bolesnici uzimaju u trenutku protočne citometrije

Ispitanici s presađenim bubregom uzimaju različite lijekove analizirali smo utjecaj lijekova na rezultate protočne citometrije.

Većina transplantiranih bolesnika liječi se zbog arterijske hipertenzije 66 (88%). U trenutku protočne citometrije najviše bolesnika uzima beta blokatore, njih 45 (60%), ACE inhibitore 32 (42,7%) ispitanika te antagoniste kalcijskih kanala 30 (40%) ispitanika.

Terapiju za šećernu bolest uzima 8 (10,7%) ispitanika. Veliki dio ispitanika odnosno njih 48 (64%) uzima statine, a nesteroidne antireumatike koristi 11 (14,7%) ispitanika (Tablica 5.7.)

Tablica 5.7.. Ispitanici po osobnoj anamnezi i po spolu

Anamneza	Broj (%) ispitanika			p*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
terapija hipertenzije (ukupno)	39 (90,7)	27 (84,4)	66 (88)	0,484
diuretici	9 (20,9)	11 (34,4)	20 (26,7)	0,291
β blokatori	28 (65,1)	17 (53,1)	45 (60)	0,345
ACE inhibitori	18 (41,9)	14 (43,8)	32 (42,7)	0,870
antagonisti kalcijskih kanala	19 (44,2)	11 (34,4)	30 (40)	0,477
antagonisti angiotenzinskih receptora	5 (11,6)	3 (9,4)	8 (10,7)	0,755
α blokatori	2 (4,7)	2 (6,3)	4 (5,3)	0,761
Ostalo (metildopa, moksonidin, minoxidil)	4 (9,3)	1 (3,1)	5 (6,7)	0,386
Terapija dijabetesa	6 (14)	2 (6,3)	8 (10,7)	0,454
Statini	25 (58,1)	23 (71,9)	48 (64)	0,237
NSAR	7 (16,3)	4 (12,5)	11 (14,7)	0,749
Ukupno	43 (100)	32 (100)	75 (100)	

*Fisherov egzaktni test

U kombinaciji antihipertenziva su najčešće diuretici s β blokatorima kod 17 (23%) ispitanika, β blokatori u kombinaciji s antagonistima kalcijskih kanala u 22 (29%) ispitanika, te ACE inhibitori s antagonistima kalcijskih kanala kod 30 (40%) ispitanika.

Analizirali smo utjecaj imunosupresiva na izražaj tlr4 i na funkciju bubrežnog presatka mjerenu klirensom kreatinina u različitim razdobljima nakon transplantacije. Bolesnici koji uzimaju tacrolimus imaju statistički značajno višu razinu TLR4 MFI. Osim toga imaju viši klirens kreatinina (Tablica 5.8.)

Tablica 5.8.. Utjecaj terapije na izražaj TLR4

Terapija	Prima terapiju	Ne prima terapiju	p*
	Medijan (25%-75%)	Medijan (25%-75%)	
Cellcept			
TLR 4 MFI	110,5 (98,6-117,6)	107,6 (96,2-119,4)	0,527
Klirens kreatinina u trenutku protočne	75,9 (48,8-104,2)	66,2 (51,8-83,8)	0,587
Kreatinin u trenutku protočne	103 (75,3-129,5)	109 (85-131,5)	0,562
Klirens kreatinina prije uključenja	105 (64,8-139,5)	120 (90-142)	0,234
Simulect			
TLR 4 MFI	108,3 (94,6-117,6)	107,8 (98,6-119,4)	0,981
Klirens kreatinina u trenutku protočne	69,2 (49,5-95,7)	68 (52,4-83)	0,676
Kreatinin u trenutku protočne	106 (85,8-128,8)	111 (85-132)	0,622
Klirens kreatinina prije uključenja	110 (76,8-128,3)	119 (90-145)	0,427
Tacrolimus			
TLR 4 MFI	110,2 (100,4-120,9)	102,9 (92,7-112)	0,025
Klirens kreatinina u trenutku protočne	74,6 (51,7-95,4)	61,3 (47,2-75,2)	0,050
Kreatinin u trenutku protočne	106 (85-129,5)	115 (84,3-134)	0,670
Klirens kreatinina prije uključenja	109 (85,5-128,5)	121 (95,3-148,8)	0,126
Ciklosporin			
TLR 4 MFI	107,8 (95,1-117,3)	109,5 (99,3-122,2)	0,185
Klirens kreatinina u trenutku protočne	63,5 (48,8-79,1)	75,1 (57,7-94)	0,119
Kreatinin u trenutku protočne	108,5 (84-135)	106 (85-127)	0,962
Klirens kreatinina prije uključenja	115,5 (90-148,8)	113 (87,5-128)	0,467
Decortin			
TLR 4 MFI	110,2 (100,3-117,5)	107,7 (96-119,5)	0,599
Klirens kreatinina u trenutku protočne	77,2 (49,2-103,5)	64,6 (51,7-83,4)	0,356
Kreatinin u trenutku protočne	103 (75,3-129,5)	109 (85-131,5)	0,562
Klirens kreatinina prije uključenja	104 (64-129)	120 (93-142,8)	0,100

5.6. Utjecaj vremena proteklog od transplantacije na izražaj tlr4 receptora

Srednja vrijednost dana proteklih od datuma transplantacije do datuma protočne je 825 dana (interkvartilnog raspona 383,5 – 1715). Nema značajne povezanosti vremena od datuma transplantacije do datuma protočne i TLR4 MFI (Spearmanov koeficijent korelacije, ρ= -0,085, p=0,529).

5.7. Genotipizacija gena za tlr4

Prilikom detekcije polimorfizama gena tlr4 rs4986790, najviše ispitanika, njih 104 (86,7%) je AA-divljeg tipa, od čega 44 (88%) iz kontrolne skupine i 60 (85,7%) transplantiranih. Kod polimorfizma rs4986791 najviše ih je s CC- divljim tipom, njih 99 (82,5%), CT-heterozigota je 19 (15,8%), a svega 2 (2,9%) transplatirana ispitanika imaju TT – mutirani oblik. Nema razlika u polimorfizmu gena za tlr4 i skupinama ispitanika (Tablica 5.9.).

Tablica 5.9. Raspodjela genotipa tlr4 **rs4986790** i **rs4986791**

	Broj (%) ispitanika						p*
	Kontrolna skupina		Transplantirani		Ukupno		
rs4986790							
AA – divlji tip	44	(88)	60	(85,7)	104	(86,7)	
AG – heterozigot	6	(12)	8	(11,4)	14	(11,7)	0,483
GG - mutirani	0		2	(2,9)	2	(1,7)	
rs4986791							
CC – divlji tip	42	(84)	57	(81,4)	99	(82,5)	
CT – heterozigot	8	(16)	11	(15,7)	19	(15,8)	0,482
TT - mutirani	0		2	(2,9)	2	(1,7)	
Ukupno	50	(100)	70	(100)	120	(100)	

*χ^2 test

Distribucija alela rs498790 za skupinu kontrola ((X2 = 0,2; p=0,65) je unutar Hardy-Weinbergovog ekvilibrija, međutim kod ispitanika s presađenim bubregom nije (X2 = 5,13; p=0,02), što se može objasniti malim uzrokom ispitanika. Distribucija alela rs4986791 za

skupinu kontrola (X2 = 0,37; p=0,53) i ispitanika s presađenim bubregom (X2 = 2,23; p=0,13) je unutar Hardy-Weinbergovog ekvilibrija.

5.8. Povezanost genotipa za tlr4 i izražaj receptora TLR4 i CD14 na monocitima periferne krvi

U skupini transplantiranih ispitanika s AA - divljim tipom za rs4986790 značajno je viši izražaj TLR4 (Mann Whitney test, p=0,004), jednako tako i za CC divlji tip za rs4986791 gdje iznosi 107,1 (interkvartilnog raspona 96,2–119,9) (Mann Whitney test, p=0,008). Unutar kontrolne skupine ili skupine transplantiranih, nije dokazana značajna razlika u izražaju tlr4 po tipu rs4986790 ili rs4986791 (Tablica 5.10.).

Tablica 5.10. Specifični polimorfizam gena za tlr4 na izražaj istog receptora na perifernim monocitima po skupinama

Skupine	Izražaj tlr4 za **rs4986790** [medijan (25%-75%)*]						p†
	AA divlji tip	p‡	AG heterozigot	p‡	GG mutirani	p‡	
Kontrolna	99,2 (90,5–110,1)	0,004	109,8 (81,7–120,9)	0,998	-	-	0,474‡
Transplantirani	107,7 (95,6–120,1)		110,2 (103,8–117,1)		99,2 (65,5–110,5)		0,701
Skupine	Izražaj tlr4 po **rs4986791** [medijan (25%-75%)*]						
	CC divlji tip	p‡	CT heterozigot	p‡	TT mutirani	p‡	
Kontrolna	99,2 (90,3–109,4)	0,008	109,8 (87–118,4)	0,509	-	-	0,474‡
Transplantirani	107,1 (96,2–119,9)		112,9 (108,8–117,6)		99,2 (65,5–110,5)		0,602

*Interkvartilni raspon;†Kruskal Wallis test; ‡Mann Whitney test

Izražaj receptora CD14 ne razlikuje se ovisno o genotipu rs4986790 kako unutar skupine transplantiranih bolesnika tako niti unutar skupine kontrola.

U polimorfizmu rs7984791 nalazimo kako je u skupini transplantiranih ispitanika s CC - divljim tipom značajno je viši izražaj CD14 (Mann Whitney test, p=0,001) u skupini

transplantiranih, gdje izražaj CD14 MFI iznosi 98,4 (interkvartilnog raspona 97,4–99,4) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.

Jednako tako, značajna je razlika u izražaju CD14 prema vrsti genotipa u rs4984791 u kontrolnoj skupini ispitanika (Mann Whitney test, p=0,018) (Tablica 5.11.).

Tablica 5.11. Specifični polimorfizam gena za CD14 na izražaj istog receptora na perifernim monocitima po skupinama

Skupine	Izražaj CD14 za **rs4986790** [medijan (25%-75%)*]						p†
	AA divlji tip	p‡	AG heterozigot	p‡	GG mutirani	p‡	
Kontrolna Transplantirani	97,6 (95,9 – 98,4) 98,4 (97,4 – 99,4)	0,002	99,1 (96,8 – 99,7) 97,1 (96,3 – 98,9)	0,197	- 97,2 (71,4 – 98,8)	-	0,078‡ 0,194
Skupine	Izražaj CD14 za **rs4986791** [medijan (25%-75%)*]						
	CC divlji tip	p‡	CT heterozigot	p‡	TT mutirani	p‡	
Kontrolna Transplantirani	97,7 (96,1 – 98,4) 98,2 (97,4 – 99,2)	0,001	99,1 (97,4 – 99,8) 98,1 (96,5 – 99,5)	0,215	- 97,2 (71,4 – 98,6)	-	0,018‡ 0,348

*Interkvartilni raspon;†Kruskal Wallis test; ‡Mann Whitney test

5.9. Biokemijsko hematološki parametri periferne krvi u trenutku protočne citometrije

U skupini transplantiranih ispitanika u trenutku protočne značajno su više vrijednosti leukocita (Mann Whitney test, p=0,008), ureje, kreatinina i C-reaktivnog proteina (Mann Whitney test, p<0,001).

Značajno je viša vrijednost hemoglobina u trenutku protočne izmjerena je u kontrolnoj skupini s vrijednosti od 134 (interkvartilnog raspona 126,8-142,3) (Mann Whitney test, p=0,020).

U kontrolnoj skupini značajno su više izmjerene vrijednosti trombocita 236 (interkvartilnog raspona 208-263,5) u odnosu na transplantirane s vrijednosti trombocita 205,5 (interkvartilnog raspona 169,3-245,3) u trenutku protočne (Mann Whitney test, p=0,002) (Tablica 5.12.).

Tablica 5.12. Srednje vrijednosti promatranih parametara u trenutku protočne po skupinama

U trenutku protočne	Medijan (25% - 75%)*			p†
	Kontrolna skupina	Transplantirani	Ukupno	
eritrociti	4,3 (4,2-4,7)	4,4 (4,1-4,7)	4,4 (4,1-4,7)	0,571
hemoglobin	134 (126,8-142,3)	129,5 (117,3-139)	132 (121-142)	0,020
leukociti	6,9 (5,8-7,6)	7,6 (6,3-8,9)	7,1 (6,1-8,3)	0,008
trombociti	236 (208-263,5)	205,5 (169,3-245,3)	222 (185,8-256,5)	0,002
glukoza	5,3 (5-6,4)	5,8 (5,3-6,1)	5,6 (5,1-6,2)	0,268
urea	4,6 (4,1-5,2)	8,2 (6,7-10)	6,4 (4,6-8,8)	<0,001
kreatini	65 (55,8-72,5)	107 (84,3-127,8)	80,5 (65-111)	<0,001
CRP	1,8 (0,9-3,1)	3,6 (1,9-7,8)	2,5 (1,1-5)	<0,001
klirens kreatinina	-	67,9 (50,6 – 84,2)	67,9 (50,6 – 84,2)	-

*Interkvartilni raspon;†Mann Whitney test

Ispitali smo povezanost pojedinih laboratorijskih pokazatelja na rezultate protočne citometrije. Spearmanovim koeficijentom korelacije dokazali smo u kontrolnoj skupini

negativnu povezanost glukoze u trenutku protočne s izražajem tlr4 receptora na perifernim monocitima (ρ= -0,448, p=0,042).

Ispitali smo utjecaj genotipa na biokemijsko hemtaološke parametre u krvi u ispitanika s presađenim bubregom. Uočavaju se značajno niže vrijednosti eritrocita (Kruskal Wallis test, p=0,037), klirensa kreatinina (Kruskal Wallis test, p=0,019) i hemoglobina (Kruskal Wallis test, p=0,009) u skupini AA-divljeg tipa rs4984790, dok su najveće izmjerene vrijednosti glukoze u skupini AG-heterozigot. Vrijednosti ureje su značajno više kod AA-divljeg tipa (Tablica 5.13.).

Tablica 5.13. Srednje vrijednosti izmjerenih parametara u trenutku protočne po **rs4984790** genotipu

U trenutku protočne	**rs4986790** [medijan (25%-75%)*]			
	AA divlji tip N=59	AG heterozigot N=7	GG mutirani N=2	p†
eritrociti	4,4 (4,1-4,6)	4,9 (4-4,9)	5,2 (3,5-19,7)	0,037
hemoglobin	127 (117-138)	142 (138-153)	150,5 (104,3-136,9)	0,009
leukociti	7,6 (6,4-8,9)	6,6 (6,2-7,7)	8,4 (5,6-22,3)	0,644
trombociti	204 (161-247)	192 (186-225)	262 (164,3-244,1)	0,455
glukoza	5,6 (5,2-6)	6 (5,7-7,1)	5,2 (3,8-19,4)	0,039
urea	8,4 (7-10)	6,7 (6,6-8,2)	4,7 (3,1-19,4)	0,039
kreatinin	108 (85-132)	94 (83-127)	97 (54,8-106,1)	0,739
klirens kreatinina	63,8 (48,3 – 82,6)	82,8 (66,7 – 101,1)	114,05(63,2– 127,5)	0,019
CRP	3,7 (2-8,1)	2,6 (1,8-11)	1,8 (0,5-17,5)	0,472

*Interkvartilni raspon;†Kruskal Wallis test

U CC-divljem tipu rs4986791 značajno su najniže vrijednosti eritrocita (Kruskal Wallis test, p=0,027), klirensa kreatinina (Kruskal Wallis test, p=0,030) i hemoglobina (Kruskal Wallis test, p=0,049) u trenutku protočne. U ostalim vrijednostima postoje razlike no one nisu značajne (Tablica 5.14.).

Tablica 5.14. Srednje vrijednosti izmjerenih parametara u trenutku protočne prema **rs4984791** genotipu

U trenutku protočne	**rs4984791** [medijan (25%-75%)*]			
	CC divlji tip N=59	CT heterozigot N=7	TT mutirani N=2	p†
eritrociti	4,3 (4,1-4,6)	4,7 (4,5-4,9)	5,2 (3,5-15,7)	0,027
hemoglobin	127 (115,5-137,5)	138,5 (129,5-147)	150,5 (104,3-132,9)	0,049
leukociti	7,6 (6,3-8,9)	7,4 (6,2-9,3)	8,4 (5,6-18,3)	0,517
trombociti	200 (161-245,3)	221 (187,5-232)	262 (164,3-240,2)	0,457
glukoza	5,8 (5,3-6,1)	5,8 (5,6-6,5)	5,2 (3,8-15,4)	0,240
urea	8,6 (7-10)	6,8 (6,3-8,6)	4,7 (3,1-15,4)	0,262
kreatinin	108 (85-131)	99 (79,3-128)	97 (54,8-102,2)	0,650
klirens kreatinina	64,3 (47,6 – 82,2)	79,6 (61,3 – 103,4)	114,1 (63,2 – 123,2)	0,030
CRP	3,7 (2-8,3)	2,9 (1,8-7,6)	1,8 (0,5-13,5)	0,736
ciklosporin	67,2 (53,9-81,5)	61,5 (44,7-155,1)	-	0,846‡

*Interkvartilni raspon;†Kruskal Wallis test; ‡Mann Whitney test

5.10. Komplikacije nakon transplantacije

Ukupno je kod 13 (18,5%) transplntiranih bolesnika došlo do neke od perioprativnih komplikacija. Od toga kod 10 muškrca i 3 žene. Ukupno je 7 bolesnika u postoperativnom tijeku razvilo simptomatske limfokele koje su tretirane perkutanom drenažom i sklerozacijom povidonom. Kod jedne bolesnice zbog položaja i veličine limfokele pokušana je laparoskopska fenstracija. Kod jednog bolesnika razvila se striktura uretre koja je endoskopski tretirana. Jedan bolesnik razvio je 4 mjeseca iza transplntacije stenozu na mjestu ureterocistoneostomije, ista je zahtjevala operativnu reanastomozu. Postoperativna hemoragija javila se kod 3 (4,3%) bolesnika i ista je zahtjevala hitnu reoperaciju. Dehiscijencija rane u postoperativnom tijeku javila se kod jedne bolesnice, ista je riješena sekundarnim šavima. Opisani rezultati prikazni su u Tablici 5.15.

Tablica 5.15. Kirurške komplikacija podjeljene po vrsti i spolu

Komplikacije	Broj komplikacija (%)		Ukupno (%)
	Muškarci	Žene	
Limfokela	5 (7,1%)	2 (2,9%)	7 (10%)
striktura uretre	1 (1,4%)	0	1 (1,4%)
striktura ureterocistoneostomije	1 (1,4%)	0	1 (1,4%)
hemoragija	3 (4,3%)	0	3 (4,3%)
dehiscijencija rane	0	1 (1,4%)	1 (1,4%)
Ukupno	10 (14,2%)	3 (4,3%)	13 (18,5%)

Različite vrste komplikacija nastupile su u razdoblju praćenja nakon transplantacije. U 35 bolesnika nalazimo različite komplikacije koje su prikazane u tablici. Najviše je bilo infekcija mokraćnog sustava. U dva bolesnika je došlo do nastanka maligne bolesti. Tijekom praćenja nismo utvrdili nastanak akutnih kardiovaskulranih komplikacija.
Raspodjela komplikacija po genotipu bolesnika prikazana je u tablicama 5.16. i 5.17..

Tablica 5.16. Raspodjela komplikacija prema genotipovima za tlr4 za rs 4986790

Komplikacije nakon tx	Broj (%) ispitanika			p*
	Divlji tip **rs4986790**	Mutirani rs4986790	Ukupno	
infekcije mokraćnog sustava	23 (71,9)	2 (66,7)	25 (71,4)	0,583
Citomegalovirusna bolest	2 (6,3)	0	2 (5,7)	
hipertenzija	4 (12,5)	0	4 (11,4)	
šećerna bolest	3 (9,4)	1 (33,3)	4 (11,4)	
Ukupno	32 (100)	3 (100)	35 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Tablica 5.17. Raspodjela komplikacija prema genotipovima za tlr4 za rs 4986791

Komplikacije nakon tx	Broj (%) ispitanika			p*
	Divlji tip **rs4986791**	Mutirani rs4986791	Ukupno	
infekcije mokraćnog sustava	20 (69)	5 (83,3)	25 (71,4)	0,699
hipertenzija	4 (13,8)	0	4 (11,4)	
šećerna bolest	3 (10,3)	1 (16,7)	4 (11,4)	
Ukupno	29 (100)	6 (100)	35 (100)	

*Fisherov egzaktni test

U bolesnika je određivan broj kopija DNA citomegalovirusa u razdoblju nakon presađivanja bubrega. Nismo utvrdili povezanost broja kopija s ispitivanim polimorfizmima (Tablica 5.18. i 5.19.)

Tablica 5.18. Raspodjela infekcije citomegalovirusom prema polimorfizamu rs4986790

rs4986790	Broj (%) ispitanika		Ukupno	p*
	Negativna CMV DNA	Pozitivna CMV DNA		
AA divlji tip	63 (80,8)	33 (91,7)	96 (84,2)	0,487
AG heterozigot	10 (12,8)	3 (8,3)	13 (11,4)	
GG - mutirani	5 (6,4)	0	5 (4,4)	
Ukupno	78 (100)	36 (100)	114 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Tablica 5.19. Raspodjela infekcije citomegalovirusom prema polimorfizamu rs4986791

rs4986791	Broj (%) ispitanika		Ukupno	p*
	Negativna CMV DNA	Pozitivna CMV DNA		
CC divlji tip	60 (74,1)	34 (91,9)	94 (79,7)	0,189
CT heterozigot	16 (19,8)	3 (8,1)	19 (16,1)	
TT - mutirani	5 (6,2)	0	5 (4,2)	
Ukupno	81 (100)	37 (100)	118 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Odgođena bubrežna funkcija utvrđena je kod 28 (45,2%) ispitanika. Osobine bolesnika prikazane su u Tablici 5.20..

Tablica 5.20. Odgođena bubrežna funkcija presatka i karakteristike ispitanika (N=46)

Osobine	Odgođena funkcija presatka	Normalna funkcija presatka	p vrijednost
Dob primatelja	53 (41 – 63)	53 (49 – 59)	0,942*
Spol primatelja	M: 10 (58,8%) Ž: 7 (41,2%)	M: 15 (53,6%) Ž: 13 (46,4%)	0,767*
Primateljeva tjelesna težina (kg)	73 (63,5 – 84,2)	77 (69 – 84)	0,278*
Dob darivatelja	56 (42,5 – 71,5)	52 (38,5 – 61)	0,326*
Nepodudarnost	3 (2,5 – 4)	3 (2 – 4)	0,661*
Divlji tip za rs rs4986790	15 (88,2%)	23 (92%)	0,683†
Mutirani tip za rs4986790	2 (11,8%)	2 (8%)	
Divlji tip za rs4986791	15 (88,2%)	21 (84%)	0,700†
Mutirani tip za rs4986791	2 (11,8%)	4 (16)	
Kreatinin kod otpusta	181 (126,5 – 333)	164 (113,3 – 350,8)	0,593*

*Mann Whitney test, †Fisherov egzaktni test

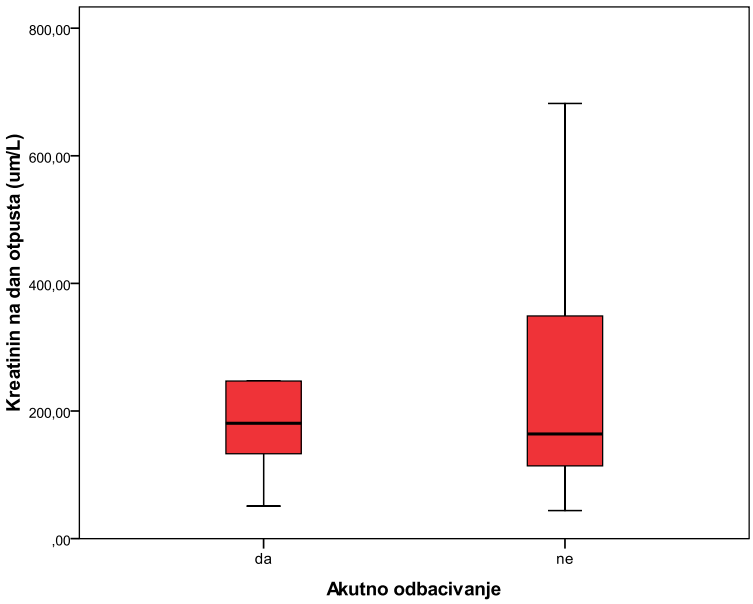
Genotip za tlr4 i izražaj istog receptora na periernim monocitima te funkcija bubrežnog prikazana je u Tablici 5.21. .

Tablica 5.21. Specifični polimorfizam gena za tlr4 na izražaj istog receptora na perifernim monocitima prema funkciji bubrežnog presatka

Odgođena funkcija	Izražaj tlr4 po **rs4986790** [Medijan (25%-75%)*]					
	AA divlji tip	p‡	AG heterozigot	p‡	GG mutirani	p‡
Da	109,28 (96,8 – 121,7)	0,276	118,4	-	87,3	-
Ne	105,4 (95,5 – 117,5)		106,1 (92,9 – 114,9)		111	
Odgođena funkcija	Izražaj tlr4 po **rs4986791** [Medijan (25%-75%)*]					
	CC divlji tip	p‡	CT heterozigot	p‡	TT mutirani	p‡
Da	109,3 (96,8 – 121,7)	0,151	118,5	-	87,3	-
Ne	103,2 (94,7 – 114,7)		112,9 (102,1 – 117,6)		111	

*Interkvartilni raspon;†Kruskal Wallis test; ‡Mann Whitney test

Kod ispitanika s odgođenom funkcijom presatka, kreatinin na dan otpusta iznosio je 181 μmol/L (interkvartilnog raspona 126,5 – 333) u odnosu na ostale transplantirane kojima je 164 μmol/L (interkvartilnog raspona 113,5 – 351) (Slika 5.2.).



Slika 5.2. Medijan i interkvartilni raspon kreatinina (μmol/L) na dan otpusta po akutnom odbacivanju

Proteinurija je pokazatelj oštećenja bubrežne funkcije ispitali smo utjecaj vremena proteklog od transplantacije na proteinuriju.

Nije utvrđena povezanosti između vremena i proteinurije (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=0,041, p=0,677). Proteinurija je određivana u srednjem vremenu od 27 mjeseci nakon transplantacije (interkvartilni raspon 16 – 52)

Nismo utvrdili povezanost genotipa sa kvalitativnim stupnjem proteinurije (Tablica 5.22. i 5.23.).

Tablica 5.22. Stupanj proteinurije prema genotipu rs4986790

proteinurija \ rs4986790	Broj (%) ispitanika				Ukupno	p*
	0	+	++	+++		
AA divlji tip	44 (88)	10 (83,3)	2 (66,7)	0	56 (84,8)	0,122
AG heterozigot	4 (8)	2 (16,7)	1 (33,3)	1 (100)	8 (12,1)	
GG - mutirani	2 (4)	0	0	0	2 (3)	
Ukupno	50 (100)	12 (100)	3 (100)	1 (100)	66 (100)	

*χ^2 test

Tablica 5.23. Stupanj proteinurije prema genotipu rs4986791

proteinurija \ rs4986791	Broj (%) ispitanika				Ukupno	p*
	0	+	++	+++		
CC divlji tip	42 (84)	9 (75)	2 (66,7)	0	53 (80,3)	0,280
CT heterozigot	6 (12)	3 (25)	1 (33,3)	1 (100)	11 (16,7)	
TT - mutirani	2 (4)	0	0	0	2 (3)	
Ukupno	50 (100)	12 (100)	3 (100)	1 (100)	66 (100)	

*χ^2 test

5.11. Hladna ishemija i funkcija bubrežnog presatka

Srednja vrijednost trajanja hladne ishemije je 14,2 sata (interkvartilnog raspona 12,5 – 16,8 sati). Srednja vrijednost trajanja hladne ishemije u satima obrnuto je proporcionalna klirensu kreatinina u trenutku protočne (Spearmanov koeficijent korelacije ρ= -0,394, p=0,004).

6. RASPRAVA

6.1. Uvod u raspravu

Istraživanje provedeno s nakanom utvrđivanja genskog polimorfizma u tlr4 genu u transplantiranih bolesnika i kontrola i izražaja tlr4 u istim skupinama. Analizirani su polimorfizmi koji su povezani sa smanjenim odgovorom na LPS.

Svi su ispitanici bili odrasle dobi, među bolesnicima s presađenim bubregom bilo je više muškaraca. Svi ispitanici su kontrolirani u jednom centru i liječeni su prema najnovijim smjernicama za liječenje bolesnika s presađenim bubregom. Akutno i kronično odbacivanje presatka rezultat je aktivacije oba kraka imunosnog odgovara (prirođene i stečene imunosti). U ovom istraživanju ispitali smo moguću ulogu tlr4 receptora. Signalni put kroz TLR može biti aktiviran kirurškom ozlijedom, odnosno ishemijsko-reperfuzijskom ozlijedom nastalom tijekom postupka transplantacije, pri čemu oštećeno tkivo otpušta tzv endogene signale opasnosti (69). Aktivacijom putem TLR dolazi do proizvodnje upalnih citokina, kemokina i do aktivacije antigen-predočnih stanica te posljedično tome aktivacije stečene imunosti (limfocita T i B).

6.2. Polimorfizam gena tlr4

U ovom istraživanju ispitivali smo prisutnost polimorfizma unutar tlr4 gena koji mogu izazvati poremećeni odgovor na agoniste navedenih receptora (70).
Supstitucija baza A896G dovodi do zamjene aminokiseline aspartata s glicinom na položaju 299 u četvrtom egzonu tlr4 gena. Osim toga opisana je supstitucija T399I koja rezultira zamjenom treonina s izoleucinom i to također u izvanstaničnom dijelu receptora (71).

Navedeni polimorfizmi povezani su sa smanjenim odgovorom monocita na LPS, apostoje i u heterozigotnom i u homozigotnom obliku. Heterozigoti za ove polimorfizme imaju smanjeni odgovor na inhalirane endotoksine, ali isto nije potvrđeno u *in vitro* pokusima na stanicama (72,73,74).

Postoji različita rasprostranjenost za polimorfizam gena tlr4 rs4986790 i tlr4 rs4986791 kod stanovništva Afrike, Azije i Europe. Zanimljivo je da u azijskim zemljama gotovo uopće nema navedenih polimorfizama, dok su kod afričkog stanovništva oniprisutni u 1-2%. U Indoouropljana ona se penje na 5%, a najviša je uočena kod naroda Baska i iznosi do 9%. Značajna frekvencija opisanih polimorfizama izražena je kod bijele rase. Studije provedene među ispitanicima u Zapadnoj Africi dokazale su prisutnost polimorfizma samo na genu za tlr4 rs4986790, dok za rs4986791 nije dokazan polimorfizam. Možemo zaključiti da diljem svijeta različite populacije imaju različitu prevalenciju tlr4 s različitim podložnostima specifičnih lokalnih infekcija.

U 10-18% afričke populacije postoji prevalencija polimorfizma gena tlr4 rs4986790, a samo 2% ispitanika iz iste skupine imaju polimorfizam gena tlr4 rs4986791. U istim skupinama polimorfizama kada je bio prisutan polimorfizam za gen tlr4 rs4986791, bio je prisutan i polimorfizam gena tlr4 rs4986790.

U Americi i Aziji gotovo da nema polimorfizma gena tlr4, osima manjeg broja slučajeva u Indoneziji gdje su zabilježeni polimorfizmi rs4986790 ili rs4986791. Kod 14% Indoeuropljana utvrđeno je da su heterozigoti za oba polimorfizma gena tlr4, dok je kod naroda Baska isti prisutan kod 18%. Ovekve studija ukazuju da su mutacije nastale u Africi prije više tisuća godina nakon čega migracijom stanovništva preko Srednjeg istoka dospjele u Europu. Analizom polimofizama gena za tlr4 rs4986790 u našoj regiji dobivene su frekvencije alela koje odgovaraju europskoj populaciji. Tako naprimjer frekvecije za ispitani gen iznose za A-alel 88%, a za G-alel 12%. Frekvencija C-alela za polimorfizam gena tlr4 rs4986791 iznosi 88 %, a frekvencija T-alela iznosi 12 %.

U našem istraživanju ispitivani polimorfizmi unutar gena za tlr4 nalaze u 14% bolesnika s presađenim bubregom (10/70) i u 16% kontrola. U skupini transplantiranih bolesnika imali smo dva homozigota za navedene polimorfizme, homozigota nije bilo među kontrolama. Ostala istraživanja pokazala su slične rezultate učestalosti ispitvanih polimorfizama u bolesnika s transplantiranim bubregom (5,75).

Istraživanja prisutnosti ispitivanih polimorfizama u darivatelja organa govore o učestalosti od 8% (16). Analizom podataka utvrdili smo kako nema razlika u polimorfizmu gena za tlr4 u kontrolnoj skupini i kod bolesnika s presađenim bubregom. Isto tako nismo

utvrdili povezanost prisutnih polimorfizama i odgođene funkcije presatka i pobola bolesnika nakon transplantacije (infekcije, kardiovaskularne i maligne bolesti).

Može se reći kako su istraživanja gena za tlr dala različite rezultate. Ducloux i suradnici utvrdili su povezanost polimorfizama D299G i T399 unutar tlr4 gena i akutnog odbacivanja bubrega (5).

Studija provedena u Koreji također je utvrdila povezanost akutnog odbacivanja i drugog polimorfizma (rs107599329) unutar gena tlr4 (76).

Istraživanje provedeno u Turskoj na 69 transplantirane djece utvrdilo je povezanost T399I polimorfizma u genu tlr4 s izostankom kronične nefropatije presatka (zaštitni polimorfizam – T399I je češće prisutan kod bolesnika koji nemaju kroničnu nefropatiju presatka (75). Također, incidencija akutnog odbacivanja bubrega statistički je značajno manja u bolesnika koji su dobili presadak od osobe koja je bila heterozigot za iste polimorfizme gena tlr4, ukazujući time na njihovu moguću zaštitnu ulogu (77).

U istraživanju provednom na sveučilišnoj klinici u Regensburgu Njemačka analizirani su polimorfizmi gena za tlr2,3,4,5 i 9, te za CD14 u 265 bolesnika s presađenim bubregom. U ovom istraživanju ispitivani su isti polimorfizmi u tlr4 koji su analizirani i u našem istraživanju. Incidencija akutnog odbacivanja je bila 35,8%, a jedino polimorfizam F412L unutar tlr3 gena bio je statistički značajno povezan sa nastankom akutnog odbacivanja.

Polimorfizam unutar tlr9 gena bio je povezan sa kardiovaskularnim bolestima u ispitivanoj populaciji (78).

Nedvano provedena studija u Indiji utvrdila je povezanost polimorfizma rs 352140 u tlr9 genu i akutnog odbacivanja bubrega (79).

Inteizivirana imunosupresivna terapija ne samo što se povezuje s infekcijama (uključujući polioma virusnu nefropatiju) i malignim bolestima, već također ima značajnu ulogu u nastanku kardiovaskularnih bolesti (akutni kardiovaskulrni događaji kao što su infarkt miokarda i zatajenje srca uzrokuju do 50% gubitaka prestaka) i zato su ove bolesti značajne u ishodu transplantacije (80).

U našem istraživanju nismo potvrdili ranija istraživanja koja su utvrdila povezanost polimorfizama unutar gena tlr4 i funkcije bubrežnog presatka, odnosno da ispitivani polimorfizmi imaju zaštitnu ulogu. Nedostatak ovako dizajniranog istraživanja može biti taj

što smo u istraživanje uključili samo one bolesnike koji imaju dobru funkciju bubrežnog presatka. Možda bi u daljnjim istraživanjima trebalo uključiti i one bolesnike koji imaju niže vrijednosti klirensa kreatinina. Osim toga mali udio (svega 14%) navedenih polimorfizama u ispitivanoj populaciji rezultira malom snagom testa za navedene ispitanike.

Prema tome, brojnost ispitanika u ovom istraživanju svakako nije dostatna za sasvim pouzdane zaključke o povezanosti polimorfizama i komplikacija nastalih u tijeku presađivanja bubrega.

6.3. Izražaj TLR4 na monocitima periferne krvi

Fenotipska obilježja perifernih monocita određivana su protočnom citometrijom dvostrukim bojanjem na TLR4 i CD14.

Prethodna istraživanja pokazala su prisutnost TLR4 i TLR2 na stanicama periferene krvi bolesnika liječenih hemodijalizom i utvrdila su viši izražaj navedenog receptora u hemodijaliziranih u usporedbi sa zdravim kontrolama (81).

Jednako tako pokazano je kako se može naći povećani izražaj istih recptora u bubrezima bolesnika s kroničnim odbacivanjem presatka, ali i u onih s akutnim odbacivanjem (82).

Osim toga različita istraživanja su pokazala utjecaj i imunsupresivne terapije na izražaj TLR receptora u transplantiranih bolesnika, s time da primjerice, metilprednisolon smanjuje izražaj, a ciklsporin povećava izražaj (83,84,85).

Istraživanja koja su analizirala izražaj mRNA za TLR4 pokazala su značajno povećanu proizvodnju mRNA u bolesnika s bubrežnim presatkom u usporedbi s kontrolama, a posebno je ovo povećanje prisutno kod cikolosporinske nefrotokičnosti (86).

Jedanko tako i pokusnim modelima ciklosporinske nefrotkosičnosti u štakora nađene su povišene vrijednosti mRNA za TLR4 (77,85,87).

Upala gingiva kod bolesnika s presađenim bubregom u radu Becerik S. i suradnika povezana je s povećanim izražajem mRNA za TLR4 i CD14 (88).

U našem istraživanju nismo našli utjecaj ciklopsorina na izražaj tlr4, ali smo utvrdili povezanost izražaja ovog receptora s uzimanjem novijeg imunosupresiva iz navedene skupine (tacrolimus). Novija istraživanja ukazuju kako u in vitro uvjetima tacrolimus i ciklosporin inhibiraju signalizaciju putem TLR u perifernim monocitima (89).

Različiti izražaj TLR4 na monocitima periferne krvi nađen je kod bolesnika koji imaju reakciju odbacivanja presatka jetre (imaju veći izražaj) u usporedbi s onima koji je nemaju (90). Zanimljivo je kako su Dunne i suradnici utvrdili kako je statistički značajno veći broj monocita pozitivnih na tlr4 u bolesnika s autoimunim bolestima koji su na imunsupresivnoj terapiji, te kako ove stanice u in vitro uvjetima nakon stimulacije proizvode veću količinu upalnih citokina (91).

U literaturi ima vrlo malo podataka o utjecaju endogenih signala opasnosti na izražaj ispitivanih receptora. Leemans i suradnici pokazali su kako endogeni signali opasnosti povećavaju izražaj TLR2 (92).
Jednako tako, u literaturi ima vrlo malo podataka o utjecaju ispitivanih polimorfizama na izražaj receptora s obzirom da je njihov izražaj najvjerojatnije posljedica djelovanja signala opsanosti. U istraživanjima bolesnika sa septičkim urušajem utvrđen je povećani izražaj TLR2 i TLR4, i to naročito tlr2 (93,94).

Nogueira i suradnici nedavno su utvrdili kako izražaj receptora ovisi o genotipu, točnije ispitanici koji imaju opisani polimorfizam imaju veći izražaj TLR4 receptora s time da kontrole imaju veći izražaj od bolesne, ispitivane skupine (95).

U ovom istraživanju utvrdili smo kako je izražaj TLR4 na perifernim monocitima (dvostruko bojanje) značajno viši u transplantiranih ispitanika. Također smo utvrdili jednako kao i Noguiera da je u skupini transplantiranih ispitanika s AA - divljim tipom za rs4986790 značajno viši izražaj TLR4 , jednako tako i za CC divlji tip.

Ovi rezultati ukazuju kako bolesnici s presađenim bubregom i prisutnim polimorfizmom imaju manji izražaj TLR4 na stanicama periferne krvi, što ih možda čini manje reaktivnim prema ednodgenim signalima opsanosti. Međutim, ovo istraživanje nije utvrdilo značaj navedenog polimorfizma na funkciju bubrežnog presatka. Uključivanje veće skupine ispitanika možda bi utvrdilo kako su ovi polimorfizmi zaštitni u transplantciji bubrega. Indirektna potvrda njihove moguće zaštitne uloge može biti izražaj ovog receptora na površini monocita koji je smanjen kod nositelja navedenih polimorfizama.
Nisu nađene razlike u izražaju receptora ovisno kombinacijama lijekova uključujući i imunospresivnu terapiju.

Ograničenje ovog istraživanja je heterogena skupina imunosuprimiranih bolesnika s različitim osnovnim bolestima koje su dovele do osnovne bubrežne bolesti.
Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se utvrdila eventualna zaštitna uloga opsianih polimorfizama u imunosti spram presatka.

U odraslih zdravih osoba otprilike 80–90% monocita su visoko pozitivni na CD14 receptor i CD16, a izražaj ovih receptora je različit u različitim subpopulacijama monocita.
Monocitoza je prisutna u različitim patološkim stanjima, uključujući upalna stanja ili zarazne bolesti (96). Jednako tako prisutna je i u upali nastaloj nakon infarkta miokarda (97).
U bolesnika s transplantiranim bubrezima monociti su povezani sa subkliničkom aterosklerozom (98).

Veći udio monocita može se naći kod bolesnika u terminalnoj fazi bubrežne bolesti (99,100). U našem istraživanju utvrdili smo značajno je manji postotak monocita u kontrolnoj skupini, u odnosu na ispitanike s presađenim bubregom.

Vereyken i suradnici također su utvrdili značajno veći udio CD16 pozitivnih monocita u bolesnika sa transplantiranim bubregom u usporedbi sa zdravim kontrolama što ukazuje na aktivaciju ovih stanica, odnosno indirektni je pokazatelj aktivacije prirođene imunosti u transplantiranih bolesnika (101).

Ograničenje našeg istraživanja je u tome što nismo tipizirali monocite prema skupinama, odnosno osim utvrđene monocitoze, ne možemo ništa više reći o svojstvima monocita.

6.4. Funkcija bubrežnog presatka i pobol bolesnika s bubrežnim presatkom

Ispitanici s presađenim bubregom koji su sudjelovali u ovom istraživanju imali su prosječno dobre funkcije presatka. Klirens endogenog kreatinina je bio reda veličine 68 (medijan 51,2 – 84,3) ml/min.

Funkcija bubrežnog presatka nije ovisila o dobi primatelja. Međutim, ovim istraživanjem smo potvrdili kako funkcija presatka ovisi o dobi darivatelja. Suresh i sur. nalaze da je funkcija bubrežnog presatka bila bolja u ispitanika koji su presadak dobili od mlađih davatelja, što je i očekivano. Ni u ovom istraživanju nije potvrđen utjecaj dobi primatelja na funkciju presatka (102).

Utvrdili smo kako ispitanici s presađenim bubregom koji su nositelji divljeg tipa jednog i drugog polimorfizma u genu za tlr4 imaju značajno niže vrijednosti klirensa kreatinina u trenutku protočne citometrije. Sniženi klirensa kreatinina je pokazatelj slabije funkcije transplantiranog bubrega u navedenih bolesnika. Ovakvi rezultati ukazuju na to kako bi ovi polimorfizmi mogli imati zaštitnu ulogu barem u dužem razdoblju nakon transplantacije bubrega. Uzroci tome svakako mogu biti vezani uz upalu, disfunkciju endotela bubrega i poremećenu bubrežnu hemodinamiku. Ovi rezultati su važni jer zapravo ima malo istraživanja polimorfizama gena imunosnog sustava s kasnom funkcijom bubrežnog presatka (103).

U istraživanju nismo utvrdili povezanost ispitivanih genotipova sa odgođenom funkcijom presatka niti sa izražajem TLR4 na monocitima periferne krvi.

Incidencija poslijetransplantacijske šećerne bolesti (PTDM, skraćeno od engl. postransplantaion diabetes mellitus) kreće se od 2% do čak 53% (104). PTDM ima negativne učinke na funkciju presatka te na preživljavanje bolesnika.

Učestalost poslijetransplantacijske šećerne bolesti u našem uzorku je u skladu s navedenim podatcima. Iako u literaturi postoje različita istraživanja koja povezuju polimorfizme različitih gena s nastankom PTDM, kao što su PAI-1 (skraćeno od engl. plasminogen activator inhibitor 1), IL-1 i IL6. U ovom istraživanju nismo utvrdili povezanost ispitivanih parametara s nastankom poslijetransplantacijske šećerne bolesti (105).

Iako se tijekom zadnjih 20-ak godina mortalitet bolesnika nakon presađivanja bubrega znatno smanjio, glavni uzrok smrti ovih bolesnika i dalje ostaju kardiovaskularne bolesti (106,107).

U nastanku kardiovaskulranih bolesti kod ovih bolesnika osim onih tradicionalnih rizičnih čimbenika sudjeluju i oni vezani uz kroničnu bubrežnu bolest i imunosupresijsku terapiju (108).

Veliki kardiovaskularni događaji (akutni infarkt, revaskularizacija miokarda ili srčana smrt) javljaju se relativno rijetko u prvih 6 mjeseci nakon transplantacije, međutim njihova učestalost se znatno povećava 5 ili više godina nakon transplantacije (109).

Povezanost genotipa za tlr4 i kardiovaskularnih bolesti u ovom istraživanju nismo utvrdili, iako se ateroskleroza povezuje s ovim polimorfizmima. Razlog tome je mali uzorak bolesnika koji su u ovom istraživanju razvili neki od velikih neželjenih kardiovaskularnih događaja

Džumhur i suradnici utvrdili su povezanost polimorfizma unutar gena tlr2 a ne tlr4 i akutnog infarkta miokarda u bolesnika liječenih u KBC Osijek (15).

6.5. Hladna ishemija i kirurške komplikacije

U našem istraživanju srednja vrijednost trajanja hladne ishemije iznosila je 14,2 sata. Poznato je kako produljena hladna ishemija dovodi do ishemijsko/reperfuzijske ozlijede presadka što povećava rizik za odgođenu funkciju presatka i nastanak epizoda akutnog odbacivanja (110).

Ditonno i suradnici imali su jedanko prosječno trajanje hladne ishemije, a o tome je ovisila neposredna funkcija bubrežnog presatka (111). Jednako tako i u našem istraživanju smo potvrdili povezanost između duljine hladne ishemije i funkcije presađenog bubrega.

Kirurške komplikacije koje se javljaju tijekom transplantacije i u ranom perioperativnom periodu dana su relativno rijetke i prihvatljivo niske incidencije. Prema litraturi u početku transplantacijske ere između 1960. i 1980. godine incidencija komplikacija iznosila je do 20% i u najvećem broju slučajeva značila je i gubitak grafta. U velikim transplantacijskim centrima danas je postotak kirurških komplakacija do 5%. Naravno da je ovome doprinos dao ukupni razvoj medicine s unaprjeđnjem imunosupresivne terapije, ali i razvoj same kirurške tehnike. Kirurške komplikacije mogu se podijeliti u osnovi u dvije grupe. To su vaskularne u koje ubrajamo arterijsku ili vensku trombozu, stenozu renalne arterije, limfocele ili hemoragije. S druge strane tu su takozvane urološke komplikacije u koje ubrajamo uretralne opstrukcije, vezikourtralni refluks ili razvoj fistula. U relativno rijetke

komplikacije ubrajamo rupturu grafta i hematom. Ove posljednje mogu se uočiti intraoperativno ili u ranom postoperativnom tijeku i za posljedicu imaju hitnu reoperaciju.
Urinarne fistule imaju prevalenciju prma litraturi iz različitih transplantacijskih centara do 5,7%. Urin se može skupljati oko transplantiranog bubrega, intraabdominalno, u području skrotuma ili manifestirati pojačanom sekrecijom na drenažu. Najčešće su razlog za nastanak fistule ureteralni problemi, odnosno insuficijencija vezikoureteralnog ušća ili ishemija i nekroza distalnog uretera. Kirurška reoperacija može biti odgođena samo u slučajevima minimalnog lika urina bez kliničkih manifestacija. U svim drugim slučajevima potrebno je bolesnika reoperirati uz prethodno eventualno postavljanje drenaže različitim minimalno invazivnim endoskopskim tehnikama. Incidencija ureteralne opstrukcije kao komplikacije javlja se u 3-8% slučajeva. Ona se može javiti kao rana komplikacija i tada je najčešće prouzročena neadekvatnom kirurškom tehnikom ili kao kasna komplikacija kada se kao uzrok najčešće navodi postoperativna stenoza samog ureterovezikalnog spoja. Klinički se komplikacija manifestira smanjenom diurezom, bolovima, povišenjem razine dušičnih metabolita u krvi. Orijentacijskom pretragom UZV-om moguće je na relativno jednostavan način dijagnosticirati opisanu komplikaciju ili istu isključiti. Naravno da se u sklopu ove kliničke slike može kriti i retencija urina, što treba imati uvijek u vidu. Tretman ove komplikacije potrebno je provesti što prije kako bi se sačuvao transplantirani bubreg. Danas u modernoj urologiji postoji čitav niz dijagnostičkih i teraputskih minimalnoinvazivnih metoda kojima se može ova komplikacija otkloniti. Ponekad je ipak potrebno učiniti otvoreni rekonstruktivni zahvat koji znači i reanastomozu uretera u mjehur. U našoj grupi ispitanika kod jednog bolesnika četiri mjeseca iza transplantacije razvila se stenoza novoformiranog ušća, što je zahtjevalo otvoreni operacijski zahvat. Tromboza renalne arterije je najgora od mogućih vaskularnih komplikacija i javlja se u postotku do 1%. Razlozi nastanka ove komplikacije mogu biti razni. Tromboza se može javiti čak i intraoperativno, kada ju je lako uočiti zbog neperfundiranosti bubrega. Ukoliko se javi u postoperativnom tijeku manifestirana je anurijom bez bolova bubrega. Hitan CD ultrazvučni prgled dati će nam jasniju sliku o promjenama koje su nastupile. Ovakvo stanje zahtjeva hitan operacijski zahvat koji najčešće završava graftektomijom. Stenoza renalne arterije javlja se u 2-10% slučejeva i manifestira se u kliničkoj slici s pojavom hipertenzije, disfunkcijom alografta odnosno akutnim odbacivanjem. Može se javiti u ranom postoperativnom tijeku ili čak i do dvije godine iza transplantacije. Stenoze koje se javljaju na mjestu anastomoze najčešće su rezultat operativne tehnike. Dijagnostika se provodi CD ultrazvučnim pregledom uz mjerenje otpora

ili rendgenološkim tehnikama. U rješavanju ovih komplikacija mogu se činiti endoskopski zahvati u smislu dilatacije ili stentiranja stenoze, odnosno otvoreni operacijski zahvat koji je potrebno provesti ukoliko je stenoza nastala na mjestu anastomoze ili se ona javila u ranom postoperativnom tijeku.

Tromboza renalne vene je rijetka komplikacija koja se javlja u 0,9-4,5% slučajeva. Budući da transplantirani bubreg nema kolateralnu cirkulaciju, ova komplikacija predstavlja veliki rizik za gubitak grafta. Klinički se može manifestirati hematurijom, oligurijom i anurijom, te bolovima u projekciji grafta i oticanjem istoga. Limfokele imaju incidenciju pojavnosti 0,6-16%. Najčšće se javljaju kao klinički nemanifestne i u tom slučaju ne zahtijevaju kirurški tretman. U ostalim situacijama potrebno je intervenirati u smislu postavljanja drenaže i sklerozacije limfocele, odnosno laparoskopske ili otvorene operacije iste ovisno o veličini, kliničkoj manifestaciji iste, te njezinom položaju. U našoj skupini bolesnika simptomatska limfokela javila se u 10% slučajeva. Iste su bile tretirane perkutanom drenažom i sklerozacijom, a kod jedne bolesnice dodatno je pokušana laparoskopska fenestracija.

7. ZNAČAJ ISTRAŽIVANJA U KLINIČKOM RADU

Presađivanjem organa između dvije nesrodne osobe inducira snažni imunosni odgovor primatelja koji može dovesti do odbacivanja presatka. Imunološka reaktivnost uglavnom je posljedica genetske različitosti između primatelja i darivatelja. U kliničkoj praksi neželjeni imunosni odgovor sprječava se optimalnom gentskom podudarnošću i imunosupresijkom terapijom. Međutim osim tradcionalne genetske podudarnosti u sustavu HLA, suvremena istraživanja analiziraju i gene drugih molekula uključenih u imunosni odgovor.
Jedan od glavnih zadataka u provođenju presađivanja organa je optimizacija imunosupresivne terapije u svrhu postizanja učinkovitog liječenja uz istodobno smanjenje neželjenih učinaka navedenih lijekova.

Određivanje genskog profila primatelja za tlr4 i izražaja ovog receptora na stanicama može nam omogućiti individualizaciju imunosupresivne terapije i prepoznavanje bolesnika koji su skloni nastanku akutnog ili kroničnog odbacivanja presatka, odnosno onih koji imaju sklonost nastanku akutnih komplikacija imunosupresivne terapije (teške bakterijske i virusne infekcije) ili kroničnih komplikacija (maligne bolesti, ateroskleroza, šećerna bolest, ciklosporinska nefrotoksičnost).

Najveći značaj oveog istraživanja je utvrđivanje moguće zaštitne uloge ispitivanih polimorfizama u genu za tlr4. Utvrdili smo kako nosioci ovog polimorfizma imaju manji izražaj istog receptora na perifernim monocitima te na taj način vjerojatno slabije reagiraju na agoniste ovog receptora (PAMP i DAMP).

8. ZAKLJUČAK

Analiza distribucije genotipa utvrdila je kako nema razlike u učestalosti pojedinačnog nukleotidnog polimorfizama_rs4986790 (Asp299Gly ili 896A/G) i rs4986791 (Thr399Ile ili 1196C/T) u tlr4 genu između ispitanika s presađenim bubregom i zdravih kontrola.

Ispitanici s presađenim bubregom imali su više vrijednosti klirensa kreatinina određivane u trenutku protočne citometrije ukoliko su dobile bubreg od mlađeg darivatelja (Spearman, ρ= -381, p=0,009).

Nema razlika s obzirom na odbacivanje presatka i dobi ispitanika s presađenim bubregom (Mann Whitney test, p=0,301) kao ni dobi darivatelja organa (Mann Whitney test, p=0,102).

Na klirens kreatinina u trenutku protočne citometrije negativni učinak ima trajanje hladne ishemije.

Analizom periferne krvi utvrđen je manji postotak monocita (%) (Mann Whitney test, p=0,001) u kontrolnoj skupini, u odnosu na ispitanike s presađenim bubregom.

TLR4 i CD14 na perifernim monocitima značajno je viši u transplantiranih ispitanika (Mann Whitney test, p=0,004) (Mann Whitney test, p=0,031).

Bolesnici koji uzimaju tacrolimus imaju statistički značajno višu razinu TLR4 te imaju bolju funkciju presatka mjerenu klirensom kreatinina.

U skupini transplantiranih ispitanika s AA - divljim tipom za rs4986790 značajno je viši izražaj TLR4 (Mann Whitney test, p=0,004), jednako tako i za CC divlji tip za rs4986791 gdje iznosi 107,1 (interkvartilnog raspona 96,2 – 119,9) (Mann Whitney test, p=0,008).

Uočavaju se značajno niže vrijednosti eritrocita (Kruskal Wallis test, p=0,037), klirensa kreatinina (Kruskal Wallis test, p=0,019) i hemoglobina (Kruskal Wallis test, p=0,009) u skupini AA-divljeg tipa rs4984790, dok su najveće izmjerene vrijednosti glukoze u skupini AG-heterozigot. Vrijednosti ureje su značajno više kod AA-divljeg tipa

U CC-divljem tipu rs4986791 značajno su najniže vrijednosti eritrocita (Kruskal Wallis test, p=0,027), klirensa kreatinina (Kruskal Wallis test, p=0,030) i hemoglobina (Kruskal Wallis test, p=0,049) u trenutku protočne.

Odgođena bubrežna funkcija i kasnije komplikacije transplantacije organa nisu povezane sa genotipom ili izražajem TLR4 na monocitima.

9. SAŽETAK

Uvod: Tlr4 predstavlja receptor za endogene alarmine koji se pojačano proizvode tijekom transplantacije. Ishemijsko reperfuzijska ozljeda povezuje se s proizvodnjom alarmina. Opisani su polimorfizmi unutar gena tlr4 koji su povezani s smanjenim odgovorom na alarmine.

Cilj istraživanja: U ovom istraživanju ispitali smo povezanost polimorfizma (rs4986790(Asp299Gly) i rs4986791 (Thr399Il) tlr4 gena i izražaja tlr4 na perifernim monocitima u bolesnika s presađenim bubregom i u zdravih kontrola. Ispitali smo utjecaj ispitivanih parametra na funkciju presađenog bubrega te na pobol bolesnika s presađenim bubregom.

Nacrt studije: Presječno istraživanje.

Ispitanici i metode: U studiju je bilo uključeno 120 ispitanika podjeljenih u dvije skupine. Skupinu bolesnika činilo je 70 bolesnika s presađenim bubregom i 50 zdravih kontrola.

Izolacija DNA učinjena je iz pune krvi na EDTA antikoagulansu primjenom komercijalnih kolona za izolaciju G-spinTM Genomic DNA Extraction Kit (Intron Biotechnology, Seul, Južna Koreja). Polimorfizmi su analizirani PCR metodom. U skupini ispitanika analizirani su podatci vezani uz funkciju presađenog bubrega (podatci darivatelja, primatelja, podudarnost, lijekovi, trajanje hladne ishemije i komplikacije.

Statistička analiza učinjena je pomoću SPSS 17.0, uz statističku značajnost ako je $p<0.05$.

Rezultati: Nije bilo razlike u distribuciji divljih i mutiranih alela između skupina ispitanika. Asp299Gly polimorfizam prisutan je u 14,3% transplantiranih bolesnika, dok se Thr399Ile nalazi u 11,3%. U svih bolesnika analizirali smo izražaj TLR-4 i CD14 na monocitima periferne krvi. Značajno je manji postotak monocita (6,4%) (Mann Whitney test, p=0,001) u kontrolnoj skupini, u odnosu na ispitanike s presađenim bubregom (7,3%).

Izražaj tlr4 i CD14 na perifernim monocitima značajno je viši u transplantiranih ispitanika.

Izražaj tlr4 ovisi o prisutnosti ispitivanog polimorfizma i o vrsti imunosupresijske terapije.

Bolesnici koji uzimaju tacrolimus imaju statistički značajno višu razinu tlr4 MFI.

U skupini transplantiranih ispitanika s AA - divljim tipom za Asp299Gly (rs4986790) značajno je viši izražaj tlr4 (Mann Whitney test, p=0,004), jednako tako i za CC divlji tip za Thr399Ile(rs4986791) gdje iznosi 107,1 (interkvartilnog raspona 96,2 – 119,9) (Mann Whitney test, p=0,008). Vrijeme proteklo od transplantacije nije imalo utjecaj na izražaj tlr4 receptora. Ispitali smo utjecaj genotipa na biokemijsko hematološke parametre u krvi u

ispitanika s presađenim bubregom. Uočavaju se značajno niže vrijednosti eritrocita (Kruskal Wallis test, p=0,037), klirensa kreatinina (Kruskal Wallis test, p=0,019) i hemoglobina (Kruskal Wallis test, p=0,009) u skupini AA-divljeg tipa rs4984790, dok su najveće izmjerene vrijednosti glukoze u skupini AG-heterozigot. Vrijednosti ureje su značajno više kod AA-divljeg tipa u CC-divljem tipu rs4986791 značajno su najniže vrijednosti eritrocita (Kruskal Wallis test, p=0,027), klirensa kreatinina (Kruskal Wallis test, p=0,030) i hemoglobina (Kruskal Wallis test, p=0,049) u trenutku protočne. Srednja vrijednost trajanja hladne ishemije je 14,2 sata (interkvartilnog raspona 12,5 – 16,8 sati). Srednja vrijednost trajanja hladne ishemije u satima obrnuto je proporcionalna klirensu kreatinina u trenutku protočne (Spearmanov koeficijent korelacije ρ= -0,394, p=0,004).

Nismo utvrdili postojanje povezanosti između polimorfizama i akutnih komplikacija presađivanja bubrega kao što je odgođena funkcija presatka ili pak s komorbiditetima nakon transplantacije.

Zaključak: Nema razlike u distribuciji genotipa prema skupinama ispitanika. Transplantirani bolesnici imaju veći izražaj tlr4 na perifernim monocitima. Genotip utječe na izražaj tlr4 tako što mutirani aleli uzrokuju slabiju ekspresiju tlr4 na monocitima. Osim toga nosioci mutiranih alela imaju bolju funkciju bubrega mjerenu klirensom kreatinina u trenutku protočne citometrije ukazjući na moguću zaštitnu ulogu mutiranih alela.

Ključne riječi: transplantacija bubrega, tlr4, SNP, protočna citometrija, kronična nefropatija prestka

10. SUMMARY

Introduction: Tlr4 is the receptor for endogenous alarmine which is overly expressed during kidney transplantation. Ischemia and reperfusion injury areassociated with the production of alarmins. It has been described, that polymorphisms within the tlr4 gene are associated with reduced responses to alarmins.

Aims: In this study, the association of polymorphism (rs4986790) Asp299Gly and (rs4986791) Thr399Il) tlr4 gene and tlr4 expressionon peripheral monocytes were examined, in patients with kidney transplant and healthy controls. The relationship of tested parameters in transplanted kidney patients with kidney function and morbidity in those patients were examined.

Type of study: A cross-sectionalstudy.

Material and Methods: Isolation of DNA was done by commercial colonies for isolation G-spinTM Genomic DNA Extraction Kit (Intron Biotechnology, Seul, South Corea). Polymorphisms were determined by real time PCR. Among the data collected from the patient groups which related to the function ofthe transplanted kidneys were: datadonors, recipients, HLA matching, medications, duration of coldischemia and complications. SPSS 16.0 was used for statistical analysis, $p<0.05$ was considered significant.

Results: There was no differencein the distribution of wild and mutant alleles between the two groups of subjects. Asp299Gly polymorphism was present in 14.3% of the transplanted patients, while the Thr399Ile was in 11.3%. The expression of tlr4 and CD14 on peripheral blood monocytes were analysed by flow cytometry. Significantly lower percentages of monocytes (6.4%) (MannWhitneytest,$p = 0.001$) were observed in the control group than within the kidney transplant recipients (7.3%). Expression of tlr4 and CD14 on peripheral monocytes were significantly higher in transplant patients.

Patients treated with tacrolimus had significantly higher levels of tlr4 MFI. In the group of patients transplanted with AA-wild-type for Asp299Gly(rs4986790) there was a significantly higher expression of tlr4 (MannWhitney test,$p = 0.004$), as well as, for the CCwild type for Thr399Ile(rs4986791), whereit was 107.1 (interquartile range 96.2 to 119.9) (MannWhitney test, $p=0.008$). Time elapsed since transplantation had no effect on tlr4 expression. We examined the effect of genotype on biochemical hematological parameters in patients with kidney transplant. Lower levels of red blood cells (Kruskal Wallis test, $p=0.037$), creatinine clearance (Kruskal Wallis test, $p=0.019$) and hemoglobin (Kruskal Wallis test, $p=0.009$) were

observed in the AAwild-type rs4984790, while the highest measured glucose was among the AG heterozygote group. Urea values were significantly higher in AA-wild type. In the CC wild type of rs4986791 had significantly the lowest values of erythrocytes (Kruskal Wallistest, p=0.027), creatinine clearance (Kruskal Wallistest, p =0.030) and hemoglobin (Kruskal Wallis test, p=0.049). The median duration of cold ischemia time was 14.2 hours (range from 12.5 to 16.8 hours). The median duration of cold ischemia in hoursis in versely proportional to the creatinine clearance at the time of flow cytometry (Spearman's rank correlation coefficient ρ=-0.394, p=0.004). There was no association between polymorphisms and acute complications of kidney transplantation, such as delayed graft function or comorbidities after transplantation encountered.

Conclusion: There was no difference in the distribution of genotypes among groups. Transplant patients have a high erexpression of tlr4 on peripheral monocytes. Genotype influences on the expression of tlr4 effect the mutant alleles in a way by causing a weaker expression of tlr4 on monocytes. Additionally, mutated allele carriers have better renal function, as measured by the creatinine clearance at the time of flow cytometry suggesting a possible protective role of mutant alleles.

Keywords: kidney transplantation, tlr4 gene, SNP, flow cytometry, chronic allograft nephropathy

11. LITERATURA

1. Game DS, Lechler RI: Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. Transpl Immunol 2002, 10(2-3):101-108.
2. Briggs JD, Berthoux F, Jones E. Predictions for future growth of ESRD prevalence. Kidney Int 2000; 57:S46-S48.
3. Arslan F, Keogh B, McGuirk P, Parker AE. tlr2 and tlr4 in ischemia reperfusion injury. Mediators Inflamm. 2010; doi:10.1155/2010/704202.
4. Liu M, Gu M, Xu D, Lv Q, Zhang W, Wu Y. Protective effects of Toll-like receptor 4 inhibitor eritoran on renal ischemia-reperfusion injury. Transplant Proc. 2010 Jun;42(5):1539-44.
5. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M et all.. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. Kidney Int. 2005;67(6):2454-61.
6. Methe H, Zimmer E, Grimm C et all. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. Transplantation. 2004;78:1324-31.
7. Zibar L, Wagner J, Pavlinić D et. al. The relationship between interferon-γ gene polymorphism and acute kidney allograft rejection. Scand J Immunol. 2011;73(4):319-24.
8. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. The New England journal of medicine 2000;343:338-44.
9. Habich C, Kempe K, Gomez FJ et all. Heat shock protein 60: identification of specific epitopes for binding to primary macrophages. FEBS Lett. 2006;580(1):115-20.
10. Krüger B, Krick S, Dhillon N i sur. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(9):3390-5.
11. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science (New York, NY 1998;282(5396):2085-8.
12. Smirnova I, Poltorak A, Chan EK, McBride C, Beutler B. Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (tlr4). Genome biology 2000;1(1):RESEARCH 002.

13. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. Molecular medicine . Cambridge, Mass 2008;14(5-6):346-52.
14. Yang QW, Xiang J, Zhou Y, Zhong Q, Li JC Targeting HMGB1/TLR4 signaling as a novel approach to treatment of cerebral ischemia. Front Biosci (Schol Ed). 2010 Jun 1;2:1081-91.
15. Džumhur A. i suradnici. Association Studies of Gene Polymorphisms inToll-Like Receptors 2 and 4 in Croatian Patients with Acute Myocardial Infarction. Scandinavian Journal of Immunology. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.
16. Nogueira E, Ozaki KS, Macusso GD et all. Incidence of donor and recipient toll-like receptor-4 polymorphisms in kidney transplantation. Transplant Proc. 2007 Mar;39(2):412-4.
17. Hwang YH, Ro H, Choi I et. al. Impact of polymorphisms of TLR4/CD14 and TLR3 on acute rejection in kidney transplantation. Transplantation. 2009;88(5):699-705.
18. Testro AG, Visvanathan K, Skinner N et all. Acute allograft rejection in human liver transplant recipients is associated with signaling through toll-like receptor 4. Gastroenterol Hepatol. 2011 ;26(1):155-63.
19. Fagerås Böttcher, M., M. Hmani-Aifa, A. Lindström, M. C. et all.. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide- induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. J. Allergy Clin. Immunol. 2004: 114:561–567.
20. Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. The Lancet infectious diseases 2005;5(3):156-64.
21. Nogueira E, Salomao R, Brunialti MK et. al. Expression of TLR-4 and -2 in peripheral mononuclear cells in renal transplant patients with TLR-4 gene polymorphism. Int Immunopharmacol. 2010 ;10(12):1481-5.
22. Aldhous P: Nobel Prize. Transplantation wins again. Nature 1990, 347(6293):507.
23. Kastelan A, Humar I, Marekovic Z: Kidney transplantation at the University Hospital Zagreb, Croatia. Clin Transpl 2000:353-354.
24. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D: Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. N Engl J Med 2000, 342(9):605-612.

25. Stela Živčić-Ćosić, Zlatko Trobonjača, Branka Sladoje-Martinović, Lidija Orlić. Komplikacije nakon presađivanja bubrega. Medicina fluminensis 2010, Vol. 46, No. 4, p. 434-447.
26. Desai MR, Ganpule AP, Gupta R. Outcome ofrenal transplantation with multiple versus singlerenal arteries after laparoscopic live donor nephrectomy: A comparative study. Urlogy 2007;5:824-7.
27. Bouchou F, Kamel G. Transplantation of kidney with multiple arteries. Transplant Proc 1986; 16:273.
28. Guerra EE, Didone EG. Renal transplant with multiple arteries. Transplant Proc 1992; 24:1868.
29. Vanroye SFS i suradnici. Early vascular complications of renal transplantation. Clin Transplant 1993; 7:496-502.
30. Oesterwitz H, Strobelt V, Scholz D, Mebel M. Extracorporeal microsurgical repair of injured multiple donor kidney arteries prior to cadaveric allotransplantation. Eur Urol 1985;11:100-5.
31. Başaran O, Moray G, Emiroğlu R, Alevli F, Haberal M. Grafts and patients outcome among recipients of renal grafts with multiple arteries. Transplant Proc 2004;36:102-4.
32. Lee RS, Bakthavatsalam R, Marsh CL, Kuhr CS. Ureteral complications in renal transplantation: A comparison of the Lich-Grigor versus the Taguchi technique. Transplant Proc 2007; 39(5):1461-4.
33. Reek C, Noster M, Burmeister D, Wolff JM, Seiter H. Urological complications of renal transplantation: A series of 900 cases. Transplant Proc 2003;35:2106-7
34. Streeter EH, Little DM, Cranston DW, Morris PJ. The urological complications of renal transplantation: A series of 1535 patients. BJU Int 2002;90:627-34.
35. Sert S, Gulay E, Hamaloglu E, Haberal M. Urological complications in 350 consecutive renal transplants. Br J Urol 1990;66:568-71
36. Flechner SM, Zhou L, Derweesh I, et al. The impact of sirolimus, mycophenolate mofetil, cyclosporine, azathioprine, and steroids on wound healing in 513 kidney-transplant recipients. Transplantation. 2003;76(12):1729-1734.
37. Valente JF, Hricik D, Weigel K, et al. Comparison of sirolimus vs. mycophenolate mofetil on surgical complications and wound healing in adult kidney transplantation. Am J Transplant. 2003;3(9):1128-1134.

38. Nanni G, Tondolo V, Citterio F, et al. Comparison of oblique versus hockey-stick surgical incision for kidney transplantation. Transplant Proc. 2005;37(6):2479-2481.
39. Filocamo MT, Zanazzi M, Li Marzi V, et al. The approach by midline incision for extraperitoneal kidney transplantation. Transplant Proc. 2007;39(10):3077-3080.
40. Meier-Kriesche HU, Arndorfer JA, Kaplan B. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft failure and patient death. Transplantation. 2002;73(1):70-74.
41. Braun WE, Banowsky LH, Straffon RA, et al. Lymphocele associated with renal transplantation: Report of 15 cases and review of the literature. Am J Med 1974; 57:714-29.
42. Hsu TH, Gill IS, Grune MT, et al. Laparoscopic lymphocelectomy: a multi-institutional analysis. J Urol 2000; 163:1096-8.
43. Fuller TF, Kang SM, Hirose R i sur. Laparoscopic treatment of symptomatic lymphocele after renal transplantation: laparoscopic versus open drainage. J Urol 2003; 169:2022-5.
44. Allen Sim i sur. Occurrence of a lymphocele following renal transplantation Singapore Med J 2013; 54(5): 259-262.
45. Brockschmidt C i sur. Minimal access kidney transplant: a novel technique to reduce surgical tissue trauma Exp Clin Transplant. 2012;10(4):319-24.
46. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. New Engl J Med. 2000;343:338-44.
47. Reiner Ž, Gamulin S Ateroskleroza. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija 6. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2005. str.187-93.
48. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. Nat Med.1999;5:1249-55.
49. Janeway C: Immunobiology: Garland Science; 2004.
50. Game DS, Lechler RI: Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. Transpl Immunol 2002, 10(2-3):101-108.
51. Rogers NJ, Lechler RI: Allorecognition. Am J Transplant 2001, 1(2):97-102.
52. Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju. Smjernice http://www.hdndt.org/. Pristupljeno 13. Listopada 2010.
53. Connor S. Nobel prize given for work on fruit flies [news]. Brit Med J. 1995;311:1044.

54. Bassett EH, Rich T (2005) Toll Receptors and the Renaissance of Innate Immunity. U: Rich T. Toll and Toll-Like Receptors: An Immunologic Perspective. Kluwer Academic, Plenum Publisher, pp 1-17
55. Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. Nature 408: 111-115.
56. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics, Cambridge University Press, Published in the Unites States of America by Cambridge University Press, pp 45-48
57. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. Circulation. 2002;105:1158-61.
58. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, i sur. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. Nat Immunol. 2003;4:1144-50.
59. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, i sur. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature. 2002;420:324-9.
60. Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. J Endocrinol. 2007;193:323-30.
61. Lorenz E, Frees K, Schwartz DA. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. Biotechniques. 2001;31:22-4.
62. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science. 2010 ; 327(5963): 291–295.
63. Billingham, R. E., L. Brent, and P. B. Medawar. 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature 172: 603–606.
64. Tesar, B. M., D. Jiang, J. Liang, S. M. Palmer, P. W. Noble, and D. R. Goldstein.2006. The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists. Am. J. Transpl. 6: 2622–2635.
65. Johnson, G. B., G. J. Brunn, Y. Kodaira, and J. L. Platt. 2002. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Tolllike receptor 4. J. Immunol. 168: 5233–5239.

66. Kaczorowski, D. J., A. Nakao, K. P. Mollen, R. Vallabhaneni, R. Sugimoto, J. Kohmoto, K. Tobita, B. S. Zuckerbraun, K. R. McCurry, N. Murase, and T. R. Billiar. 2007. Toll-like receptor 4 mediates the early inflammatory response after cold ischemia/reperfusion. Transplantation 84: 1279–1287.
67. Koedel U. i suradnici Acute Brain Injury Triggers MyD88-Dependent, TLR2/4-Independent Inflammatory Responses. AJP 2007; 171:200-213.
68. Porrett PM i suradnici. Mechanisms Underlying Blockade of Allograft Acceptance by TLR Ligands. J Immunol 2008; 181:1692-1699.
69. Lin T, Zhou W, Sacks SH. The role of complement and Toll-like receptors in organ transplantation. Transpl Int 2007;20:481–9
70. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet 2000;25:187–91.
71. Christopher SchmittPolymorphisms of TLR4: Rapid Genotyping and Reduced Response to Lipopolysaccharide of TLR4 Mutant Alleles. Clinical Chemistry 48:10 1661–1667 (2002)
72. Erridge C, Stewart J, Poxton IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling. J Exp Med 2003;197:1787–91.
73. von Aulock S, Schroder NW, Traub S, Gueinzius K, Lorenz E, Hartung T, et al. Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acidinduced chemokine and inflammatory responses. Infect Immun 2004;72: 1828–31.
74. van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by Candida albicans blastoconidia and hyphae. Infect Immun 2005;73:7458–64.
75. Mutlubas F. i suradnici. Association Between Toll-like Receptors 4 and 2 Gene Polymorphisms With Chronic Allograft Nephropathy in Turkish Children. Transplantation Proceedings,2009, 41, 1589–1593.
76. Hwang YH, Ro H, Choi I, Kim H, Oh KH, Hwang JI, Park MH, Kim S, Yang J, Ahn C. Impact of polymorphisms of TLR4/CD14 and TLR3 on acute rejection in kidney transplantation. Transplantation. 2009 Sep 15;88(5):699-705.

77. Palmer SM, Burch LH, Smith SR, et al: Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. Clin Transplant 20:30, 2005
78. Kruger B. i suradnici. A comprehensive genotype–phenotype interaction of different Toll-like receptor variations in a renal transplant cohort Clinical Science (2010) 119, 535–544
79. Srivastava P. i suradnici. Association studies of Toll-like receptor gene polymorphisms with allograft survival in renal transplant recipients of North India Clin Transplant 20.12: 26: 581-588.
80. Kruger, B.i suradnici. Is inflammation prior to renal transplantation predictive for cardiovascular and renal outcomes? Atherosclerosis (2010)210, 637–642.
81. Gollapudi P, Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND. Leukocyte toll-like receptor expression in end-stage kidney disease. Am J Nephrol 31:247-54.
82. Nogueira E, Ponciano VC, Naka EL, Marques GD, Cenedeze MA, Camara NO, et al. Toll-like receptors-related genes in kidney transplant patients with chronic allograft nephropathy and acute rejection. Int Immunopharmacol 2009;9:673–6.
83. Martins PS, Brunialti MK, Martos LS, Machado FR, Assuncao MS, Blecher S, et al. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. Crit Care 2008;12:R25.
84. Pons J, Sauleda J, Regueiro V, Santos C, Lopez M, Ferrer J, et al. Expression of Tolllike receptor 2 is up-regulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res 2006;7:64.
85. Lim SW, Li C, Ahn KO, Kim J, Moon IS, Ahn C, et al. Cyclosporine-induced renal injury induces toll-like receptor and maturation of dendritic cells. Transplantation 2005;80:691–9.
86. Kwon J, Park J, Lee D, Kim YS, Jeong HJ. Toll-like receptor expression in patients with renal allograft dysfunction. Transplant Proc. 2008 Dec;40(10):3479-80.
87. Cunningham PN, Wang Y, Guo R, et al: Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. J Immunol.172:2629, 2004
88. Sema Becerik i sur. Toll like receptor 4 and membrane-bound CD14 expressions in gingivitis, periodontitis and CsA-induced gingival overgrowth – in press
89. Howell J i sur. Cyclosporine and tacrolimus have inhibitory effects on toll-like receptor signalling after liver transplantation. Liver Transpl. 2013 Jul 25.- in press

90. Adam G Testro,,† Kumar Visvanathan,‡ Narelle Skinner,‡ Vesna Markovska,‡ Peter Crowley,† Peter W Angus,† and Paul J Gow,†Acute allograft rejection in human liver transplant recipients is associated with signaling through toll-likereceptor 4Journal of Gastroenterology and Hepatology 26 (2011) 155–163.
91. Dana W. Dunne1 i sur. Increased TLR4 Expression and Downstream CytokineProduction in Immunosuppressed Adults Compared to Non-Immunosuppressed Adults, PLoS ONE June 2010.Volume 5. Issue 6. e11343
92. Leemans JC, Butter LM, Pulskens WP, Teske GJ, Claessen N, van der Poll T, et al. The role of Toll-like receptor 2 in inflammation and fibrosis during progressive renal injury. PLoS ONE 2009;4:e5704.
93. Martins PS, Brunialti MK, Martos LS, Machado FR, Assuncao MS, Blecher S, et al. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. Crit Care 2008;12:R25.
94. Brunialti MK, Martins PS, Barbosa de Carvalho H, Machado FR, Barbosa LM,Salomao R. TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. Shock 2006;25:351–7.
95. Nogueira E, Salomao R, Brunialti MK et. al. Expression of TLR-4 and -2 in peripheral mononuclear cells in renal transplant patients with TLR-4 gene polymorphism. Int Immunopharmacol. 2010 ;10(12):1481-5.
96. Janols H, Bredberg A, Thuvesson I, Janciauskiene S, Grip O, et al. (2010) Lymphocyte and monocyte flow cytometry immunophenotyping as a diagnostic tool in uncharacteristic inflammatory disorders. BMC Infect Dis 10: 205.
97. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK (2010) Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. Circulation 121: 2437–2445.
98. Ulrich C, Heine GH, Gerhart MK, Kohler H, Girndt M (2008) Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients. Am J Transplant 8: 103–110.
99. Nockher WA, Scherberich JE (1998) Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. Infect Immun 66: 2782–2790.

100. Saionji K, Ohsaka A (2001) Expansion of CD4+CD16+ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. Acta Haematol 105: 21–26.
101. Elly J. F. Vereyken i suradnici. A Shift towards Pro-Inflammatory CD16+ Monocyte Subsets with Preserved Cytokine Production Potential after Kidney Transplantation. July 2013.Volume 8. Issue 7,e70152.
102. Suresh V, Carey BS, Shaw S, Tse WY, Cartwright N, Akoh J, McGonigle R, Rowe P, Shaw J, Kaminski E: A retrospective study of the prognostic impact of cytokine secretion in mixed lymphocyte culture on long-term graft function following allogeneic renal transplantation. Transpl Int 2005, 18(9):1067-1071.
103. Grafals M, Kamal L, Chung D, Abdi R. Gene polymorphisms in renal transplantation. Semin Nephrol. 2010 Jul;30(4):418-25.
104. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, et al: Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. Am J Transplant. 2003;3:178.
105. S.-C. Weng i suradnici Gene Polymorphisms Are Associated With Posttransplantation Diabetes Mellitus Among Taiwanese Renal Transplant Recipients. Transplantation Proceedings, 44, 667–671 (2012))
106. Kasiske BL, Guijarro C, Massy ZA, et al: Cardiovascular disease after reanal transplantation. J Am Soc Nephrol 7:158, 1996
107. Fellstrom B: Risk factors for and management of posttransplantation cardiovascular disease. BioDrugs 15:261, 2001)
108. Silver SA, Huang M, Nash MM, Prasad GV. Framingham risk score and novel cardiovascular risk factors underpredict major adverse cardiac events in kidney transplant recipients. Transplantation. 2011 Jul 27;92(2):183-9
109. Salerno MP i suradnic. Evolution of Causes of Mortality in Renal Transplantation in the Last 10 Years. Transplantation Proceedings, 42, 1077–1079 (2010)
110. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg. 1994;81:637
111. Ditonno P, Impedovo SV, Palazzo S, Bettocchi C, Gesualdo L, Grandaliano G, Selvaggi FP, Battaglia M. Effects of ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: risk factors and early and long-term outcomes in a single center. Transplant Proc. 2013 Sep;45(7):2641-4.

12. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:	Damir Prlić
Adresa:	Vijenac S. Kolara 2, 31 000 Osijek
Datum rođenja:	13. prosinca 1964.
Narodnost:	Hrvat
Državljanstvo:	Republike Hrvatske
Bračni status:	oženjen, otac troje djece
Obrazovanje:	Osnovnu školu završio u Osijeku 1983. maturirao u Općoj gimnaziji u Osijeku 1984.-1991. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 1997/98. Poslijediplomski stručni studij iz urologije , Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.
Zvanje:	doktor medicine, diplomirao 5. svibnja 1992. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 1996. doktor medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta Essen – Njemačka, s temom «Radikalna prostatektomija – operativne tehnike i perioperativne komplikacije».
Stručno zvanje:	specijalist urolog, specijalistički ispit položio 9. srpnja 1998.
Zaposlenje:	1991.-1992. Liječnički staž u Hrvatskoj vojsci. 1992.-1994. Znanstveni novak u Znanstvenoj jedinici za kliničko-medicinska istraživanja KB Osijek. 1994.-1998. specijalizant iz urologije na Klinici za urologiju KB Osijek. 1998. Specijalizirao urologiju, od tada uposlen na Klinici za urologiju KB Osijek.
Stručno usavršavanje:	1992. u trajanju od 4 mjeseca, u okviru TEMPUS projekta, boravio je na Institutu za medicinsku informatiku i biomatematiku, Univerzitetska klinika u Essenu – Njemačka. 1994.-1995. Usavršavanje u okviru specijalizacije iz urologije na Klinici za urologiju, dječju urologiju i urološku onkologiju Evangelističke bolnice Huyssens-Stiftung, Essen – Njemačka.

SUDJELOVANJE U ZNANSTVENIM I STRUČNIM PROJEKTIMA:

1. 1992.-1995. Multicentrični program istraživanja urolitijaze u Republici Hrvatskoj (br. 3-01-188). SIZ - znanosti R. Hrvatske.
2. 1992. - 1995. Metabolic and Physcochemical studies underlyng the assessment of the risk and the prevention of Kidney stone formation, (br C11*-0345-yu(A)) Projekt financiran od EEZ-a.
3. 1990.-1991. TEMPUS (br. JEP 2503/91). Projekt financiran od EEZ-a.
4. 1997. Regulacija staničnog ciklusa kod karcinoma prostate (br.127005), Projekt financiran od Ministarstva znanosti i tehnologije R. Hrvatske.
5. 2002. Destrukcija tumora magnetskim nanočesticama vezanim uz protutijela (br. 0219062) Projekt financiran od Ministarstva znanosti i tehnologije R.Hrvatske.
6. 2002. - Određivanje faktora rizika i prevencija stvaranja mokraćnih kamenaca (Br. 0219201) Ministarstva znanosti i tehnologije R. Hrvatske.

NASTAVNA AKTIVNOST

Sudjelovanje u dodiplomskoj nastavi:

- Od 1998. godine Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku sudjeluje u nastavi iz Urologije (seminari i vježbe).
- Od 1998. godine Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku sudjeluje u nastavi iz elektivnog predmeta Urolitijaza (vježbe i seminari).

13. POPIS KRATICA

A	adenin
APC	stanica koja predočuje antigen (engl. antigen presenting cell)
C	citozin
CAN	kronična nefropatija presatka engl. chronic allograft nephropathy
DAMP	skraćeno od eng. damage associated molecular patterns
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
G	gvanin
HLA	antigeni glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka (engl. *Human Leukocyte Antigen*)
IFN	interferon
IFN-γ	interferon gama
IL	interleukin
IL-2	interleukin 2 (engl. *interleukin 2*)
LPS	lipopolisaharid
MHC	glavni kompleks tkivne snošljivosti (engl. major histocompatibility complex)
mRNA	Glasničkaribonukleinskakiselina (engl. *messengerribonucleicacid*)
NF-κB	jezgrin čimbenik kapa B (engl. nuclear factor-kappa B)
NF-κB	jezgrin čimbenik kappa B (engl. *nuclear factor kappa B*)
PAMP	patogenima pridruženi molekularni sljedovi (engl. *pathogen associated molecular patterns*)
PCR	polimerazna lančana reakcija (engl. *polymerase chain reaction*)
PRR	receptori za prepoznavanje uzorka (engl. *pattern recognition receptor)*
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)
T	timin
TCR	receptor za limfocit T (engl. T-cell receptor)
TGF-β1	transformirajući čimbenik rasta beta 1 (engl. transforming growth factor beta 1)

TLR	toll-u slični receptori (engl. *toll-like receptors*)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (engl. tumor necrosis factor)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha)*

Ekstra

46. Medzhitov R. Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity. J Immunol. 2013 Nov 1;191(9):4473-4.