Kliničko i imunološko praćenje bolesnika nakon presađivanja bubrega

Živčić-Ćosić, Stela

Doctoral thesis / Disertacija

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:188:321202

Rights / Prava: Attribution 4.0 International/Imenovanje 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

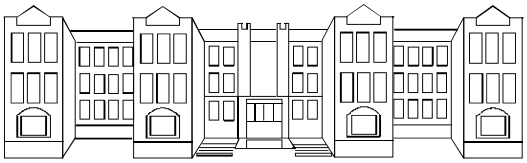
Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

Stela Živčić-Ćosić

KLINIČKO I IMUNOLOŠKO PRAĆENJE BOLESNIKA NAKON PRESAĐIVANJA BUBREGA

Doktorska disertacija

Rijeka, 2009.

Mentor rada: **prof.dr.sc. Zlatko Trobonjača**

Doktorska disertacija obranjena je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1._____
2._____
3._____
4._____
5._____

Rad ima _____ listova

UDK: _____

Zahvala

Zahvaljujem se svojem mentoru prof.dr.sc. Zlatku Trobonjači na njegovoj iznimnoj pomoći i vrijednim savjetima tijekom izrade ovog rada, koji se temelji na rezultatima dugogodišnje transplantacijske aktivnosti u našem centru.

Zahvaljujem i svojim kolegama i suradnicima te svima koji su mi na bilo koji način pomogli u provedbi ovog istraživanja i izradi doktorske disertacije.

Zahvaljujem svojim najdražima na velikoj pomoći i podršci pri izradi ovog rada.

SAŽETAK

Cilj: Kliničko i imunološko praćenje bolesnika s presađenim bubregom u KBC-u Rijeka te procjena imunosne reaktivnosti primatelja bubrežnog presatka, koji primaju anti-CD25 monoklonsko protutijelo daklizumab u sklopu standardnog imunosupresivnog protokola.

Bolesnici i metode: Retrospektivna analiza obuhvaća kliničke podatke o 588 bolesnika, kojima je presađen bubreg u KBC-u Rijeka u proteklom gotovo 25-godišnjem razdoblju. Prospektivno randomizirano istraživanje obuhvaća primatelje bubrežnog presatka od 2006. do 2008. g. Iz ispitivanja su isključeni bolesnici s pozitivnim biljezima na hepatitis B ili C. Imunosna reaktivnost bolesnika određivana je analizom staničnog ciklusa limfocita periferne krvi, metodom protočne citometrije. Kontrolne skupine činili su zdravi darivatelji krvi i bolesnici na liječenju redovitom dijalizom.

Rezultati: Kumulativno preživljavanje bolesnika i bubrežnih presadaka od 2001. do 2007. g. postalo je značajno bolje u odnosu na primatelje u razdoblju od 1985. do 1995. g. Tijekom 25-godišnjeg razdoblja, najčešći uzroci smrti bili su srčanožilne bolesti, infekcije i zloćudni tumori. Među zloćudnim tumorima najčešće se javljao karcinom kože, a potom karcinom bubrega i uretera. U bolesnika s endemskom nefropatijom nađena je visoka učestalost karcinoma prijelaznog epitela s lošom prognozom. Tijekom razdoblja praćenja zabilježen je porast prosječne starosne dobi bolesnika, značajan porast udjela muških primatelja bubrežnog presatka te značajno smanjenje učestalosti kroničnog glomerulonefritisa kao uzroka završnog bubrežnog zatajenja. Bolje preživljavanje presatka uočeno je u primatelja koji su bolovali od policistične bolesti bubrega, dok je značajno lošije bilo u slučaju primatelja ili darivatelja starijih od 50 g., te u muških primatelja nakon presađivanja bubrega od

ženskih darivatelja. U prospektivnom dijelu ispitivanja, analizom staničnog ciklusa, uočeno je da tijekom prvih šest tjedana nakon presađivanja bubrega dolazi do postupnog pada proliferativnog odgovora limfocita T u odnosu na kontrolne skupine. Daklizumab je, ovisno o dozi, blokirao anti-CD3 potaknutu proliferaciju limfocita T te je doveo do naglog pada zastupljenosti IL-2 receptora na njihovoj membrani, dok je izražaj IL-2 receptora na stanicama NK varirao na niskoj razini. Uočen je i pad zastupljenosti ukupnih limfocita T, pomoćničkih i citotoksičnih stanica te limfocita B. U kasnijoj fazi, od 2.-6. tj. nakon presađivanja, zastupljenost ovih stanica se normalizirala. NK stanice su neposredno nakon presađivanja pokazale porast postotnog udjela, koji se u kasnijoj fazi ponovno normalizirao.

Zaključak: Ovi rezultati predstavljaju značajan doprinos kliničkom praćenju bolesnika s bubrežnim presatkom i optimizaciji imunosupresivnog liječenja, s ciljem da se smanje neželjeni učinci prekomjerne imunosupresije i da se poboljša preživljavanje bolesnika i presatka.

Ključne riječi: daklizumab; endemska nefropatija; imunofenotipizacija limfocita; imunosupresija; interleukin-2 (IL-2) receptor; protočna citometrija; stanični ciklus limfocita; transplantacija bubrega

SUMMARY

Aim: Clinical and immunological follow-up of renal allograft recipients in UHC Rijeka and estimation of the immune reactivity of patients receiving the anti-CD25 monoclonal antibody daclizumab, in combination with the standard immunosuppressive protocol.

Patients and methods: Retrospectively, clinical data on 588 patients who received a renal allograft in UHC Rijeka over an almost 25 year period, were analyzed. The prospective randomized trial included recipients of renal allografts from 2006 until 2008. Excluded were patients with positive hepatitis B or C markers. The patients' immune reactivity was determined by analyzing the cell cycle of peripheral blood lymphocytes with flow-cytometry. Control groups were healthy blood donors and patients undergoing regular dialysis treatment.

Results: Cummulative patient and graft survival of transplants performed during the period from 2001 until 2007 became significantly better than for kidney recipients in the period from 1985 until 1995. Over the 25 year period, most common causes of death were cardiovascular disease, infections and malignant tumors. The most common malignant tumor was skin cancer, followed by kidney and uretheral cancer. In patients with endemic nephropathy, a high incidence of urothelial cancer was observerd with a poor prognosis. During the follow-up period an increase in the patients' age average, a significant increase in the proportion of male renal allograft recipients and a significant decrease in the incidence of chronic glomerulonephritis as primary renal disease were observed. Recipients with polycystic kidney disease had better graft survival while the survival was significantly worse in case of recipients or donors age over 50 and in male recipients of kidneys from female donors. In the prospective part of the trial, cell cycle analysis showed a step-wise decrease of the

proliferative response of T lymphocytes in comparison to the control groups during the first six weeks after renal transplantation. Daclizumab inhibited, dose-dependently, the anti-CD3 stimulated proliferation of lymphocytes T and lead to a sudden drop in the proportion of IL-2 receptors on their membrane, while the expression of IL-2 receptors on NK cells varied at a low level. A drop of the proportion of all T lymphocytes, both helper and cytotoxic cells as well as of B lymphocytes was observed. Over a period of two to six weeks after transplantation, the proportion of these cells normalized. NK cells showed a rise of their proportion immediately after engraftment, which normalized again in the latter phase.

Conclusion: These results represent a valuable contribution for the clinical follow-up of renal transplant recipients and the optimization of immunosuppressive treatment, in order to minimize side effects of overimmunosuppression and to improve patients and graft survival.

Key words: Daclizumab; Endemic Nephropathy; Flow Cytometry; Immunosuppression; Interleukin-2 (IL-2) Receptor; Lymphocyte Cell Cycle; Lymphocyte Cell Immunophenotyping; Renal Transplantation

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

1. 1. Povijesni pregled razvoja metoda nadomjesnog liječenja u bolesnika sa završnim stupnjem bubrežnog zatajenja ...…….. 1

1. 1. 1. Razvoj dijalize ……. 1

1. 1. 2. Razvoj presađivanja bubrega …… 3

1. 2. Presađivanje bubrega …… 7

1. 2. 1. Obrada i priprema primatelja bubrežnog presatka …… 7

1. 2. 2. Darivatelji organa ……... 8

1. 2. 3. Značaj krvnih grupa i antigena tkivne podudarnosti ……. 10

1. 2. 3. 1. Značaj krvnih grupa …… 10

1. 2. 3. 2. Značaj antigena tkivne podudarnosti …… 11

1. 2. 4. Sustav dodjele organa …… 12

1. 3. Imunobiologija presađivanja …… 13

1. 3. 1. Imunosna (transplantacijska) reakcija …… 14

1. 3. 2. Obilježja imunosne reakcije ……... 15

1. 3. 2. 1. Početni razvoj imunosne reakcije odbacivanja presatka …….. 16

1. 3. 2. 2. Prepoznavanje aloantigena …….. 16

1. 3. 2. 3. Aktivacija limfocita T (signal 1) …….. 17

1. 3. 2. 4. Kostimulacija limfocita T (signal 2) …… 19

1. 3. 2. 5. Limfociti B ……. 20

1. 3. 2. 6. Klonalna ekspanzija i dozrijevanje limfocita ……. 20

1. 3. 2. 7. Efektorski mehanizmi …….. 20

1. 4. Imunosupresivno liječenje ……. 23

1. 4. 1. Imunosupresivni lijekovi …… 24

1. 4. 1. 1. Kortikosteroidi …….. 24

1. 4. 1. 2. Inhibitori kalcineurina ciklosporin i takrolimus ……... 25

1. 4. 1. 3. Mikofenolat mofetil ……. 27

1. 4. 1. 4. Azatioprin …… 28

1. 4. 1. 5. „TOR“ inhibitori: sirolimus i everolimus …….. 29

1. 4. 1. 6. Poliklonska antilimfocitna protutijela……. 30

1. 4. 1. 6. 1. Antilimfocitni globulini …….. 30

1. 4. 1. 6. 2. Intravenski imunoglobulini …… 32

1. 4. 1. 7. Monoklonska antilimfocitna protutijela ……. 32

1. 4. 1. 7. 1. OKT3 ……... 33

1. 4. 1. 7. 2. Humanizirana anti-CD25 monoklonska protutijela …… 33

1. 4. 2. Imunosupresivni protokol …….. 35

1. 4. 3. Reakcija odbacivanja presatka i njezino liječenje ……... 38

1. 4. 4. Razvoj novih lijekova i metoda liječenja kod presađivanja bubrega 41

1. 5. Pokazatelji reakcije odbacivanja presatka …….. 48

1. 5. 1. Kliničko praćenje bolesnika i funkcije presatka …….. 48

1. 5. 2. Slikovne metode prikaza presatka i njegove funkcije …….. 51

1. 5. 3. Patohistološki pokazatelji reakcije odbacivanja …….. 53

1. 5. 4. Imunosno praćenje i nove tehnike u procjeni funkcije presatka……. 55

1. 5. 5. Stanični diobeni ciklus …… 58

1. 5. 5. 1. Faze staničnog ciklusa …….. 59

1. 5. 5. 2. Regulacija staničnog ciklusa …… 61

1. 5. 5. 3. Inhibitori staničnog ciklusa ……. 62

1. 5. 5. 4. Kontrolne točke ……. 63

1. 5. 5. 5. Poremećaji regulacije staničnog ciklusa ……. 63

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 65

3. ISPITANICI I METODE 66

3. 1. Ispitanici ……. 66

3. 1. 1. Opći podatci o ispitanicima …… 66

3. 1. 2. Etički aspekti istraživanja …….. 66

3. 2. Metode ……. 67

3. 2. 1. Analiza podataka o primatelju i darivatelju bubrežnog presatka te samom postupku presađivanja ……. 67

3. 2. 2. Imunosupresivno liječenje…….. 67

3. 2. 2. 1. Imunosupresivni lijekovi …….. 67

3. 2. 2. 2. Imunosupresivni protokol ……... 68

3. 2. 3. Metode praćenja bolesnika i funkcije presatka …… 71

3. 2. 3. 1. Klinički i laboratorijski parametri …….. 71

3. 2. 3. 2. Slikovne metode prikaza presatka i njegove funkcije ……... 72

3. 2. 3. 3. Neželjene pojave i komplikacije liječenja ……... 72

3. 2. 4. Imunosno praćenje bolesnika ……. 73

3. 2. 4. 1. Materijal i reagencije ……... 73

3. 2. 4. 2. Izdvajanje stanica periferne krvi …… 74

3. 2. 4. 3. Protokol analize …… 75

3. 2. 4. 4. Protočna citometrija ……. 76

3. 2. 4. 4. 1. Određivanje fenotipske pripadnosti stanica …… 77

3. 2. 4. 4. 2. Direktna imunoflourescencija ……... 77

3. 2. 4. 5. Određivanje staničnog ciklusa…….. 78

3. 2. 4. 5. 1. Priprema uzoraka za određivanje staničnog ciklusa……... 79

3. 2. 4. 5. 2. Određivanje proliferativnog odgovora limfocita…….. 79

3. 2. 4. 5. 3. Određivanje postotne zastupljenosti CD25 biljega na limfocitima periferne krvi……. 81

3. 2. 5. Statistička obrada podataka ……..……. 81

4. REZULTATI 82

4. 1. Retrospektivna analiza…… 82

4. 1. 1. Podatci o primateljima i darivateljima bubrežnog presatka ….. 82

4. 1. 2. Kumulativno preživljavanje primatelja i presatka……...…. 89

4. 1. 3. Uzroci smrti u primatelja bubrežnog presatka…...…… 91

4. 1. 3. 1. Maligni tumori ..…… 92

4. 1. 4. Utjecaj kliničkih i imunoloških čimbenika na preživljavanje presatka…….. 96

4. 2. Rezultati prospektivne analize…….. 114

4. 2. 1. Klinički podatci o primateljima i darivateljima bubrežnog presatka…….. 114

4. 2. 2. Analiza imunosnih parametara……..... 120

4. 2. 2. 1. Fenotipske promjene limfocita periferne krvi bolesnika nakon presađivanja bubrega…… 120

4. 2. 2. 2. Analiza staničnog diobenog ciklusa limfocita periferne krvi bolesnika nakon presađivanja bubrega …….. 126

5. RASPRAVA **141**

6. ZAKLJUČCI **153**

7. LITERATURA **155**

POPIS SKRAĆENICA **179**

ŽIVOTOPIS **181**

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Povijesni pregled razvoja metoda nadomjesnog liječenja u bolesnika sa završnim stupnjem bubrežnog zatajenja

Nadomjesno liječenje dijalizom i presađivanjem bubrega u bolesnika sa završnim stupnjem bubrežnog zatajenja ubraja se u najznačajnije uspjehe medicine. Time je omogućeno liječenje bolesnika koji su ranije bili osuđeni na umiranje, najčešće u uremičnom sindromu. Novija saznanja i tehnološki napredak omogućili su da dijaliza i presađivanje bubrega postanu učinkovite i rutinske metode liječenja kojima je cilj otklanjanje simptoma i znakova uremije te fizička i psihosocijalna rehabilitacija bolesnika.

1.1.1. Razvoj dijalize

Thomas Graham, kemičar iz Glasgowa, otkrio je 1861. g. da otopljene tvari putuju prema području niže koncentracije i definirao je dijalizu kao „difuziju otopljenih tvari kroz membranu" (1). Ovaj fizikalni proces našao je najvažniju primjenu u liječenju patoloških stanja nastalih zakazivanjem bubrega, a najznačajnije tekovine s tog područja su hemodijaliza i peritonejska dijaliza. Prvi slučaj izlječenja akutne uremije uspio je peritonejskom dijalizom Wearu i suradnicima 1936. g., a Kolff je 1944. g. postigao adekvatno izlučivanje mokraćevine iz krvi u svom dijalizatoru, danas općenito poznatom pod nazivom "umjetni bubreg". "Umjetni bubreg" razvio se iz uređaja koji je 30 g. ranije počeo upotrebljavati Abel u pokusima vividifuzije. Izum silastično-teflonskog shunta Quintona, Dillarda i Scribnera 1960. g. omogućio je ponovljene dijalize preko istog pristupa krvotoku i započeto je liječenje redovitim hemodijalizama bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem (2-5).

Peritonejska dijaliza koristila se do 1980-ih godina manje, jer su bile česte komplikacije i lošiji rezultati liječenja. Međutim, usavršavanjem materijala i tehnika provođenja, peritonejska dijaliza postala je dobro afirmirana metoda liječenja. Boen i Lasker su početkom 1960-ih godina uveli liječenje automatiziranom peritonejskom dijalizom, a Popovich i Moncrief 1976. g. liječenje kontinuiranom ambulatornom peritonejskom dijalizom (CAPD, prema engl. continuous ambulatory peritoneal dialysis) (6-8). Tenckhoffov pronalazak trajnog intraperitonejskog katetera, liječenje CAPD-om i zamjena staklenih boca s tekućinom za dijalizu plastičnim vrećicama 1978. g., dovelo je do značajnog smanjenja komplikacija i sve šire primjene peritonejske dijalize (9-11). Krajem 1970-ih uveli su Diaz-Buxo i Suki tehniku kontinuirane cikličke peritonejske dijalize (CCPD, prema engl. continuous cycling peritoneal dialysis), koja omogućuje da uređaj (engl. cycler) vrši izmjene otopine za dijalizu (12,13).

U Rijeci je 1961. g. nabavljen "umjetni bubreg". Pod vodstvom prof. dr. sc. Jerka Zeca prvi puta je u tadašnjoj državi primijenjena hemodijaliza u bolesnika s akutnim bubrežnim zatajenjem 16. lipnja 1962., a peritonejska dijaliza 31. prosinca 1963. g. (14,15). Prvi bolesnik s kroničnim bubrežnim zatajenjem primljen je na liječenje peritonejskom dijalizom 1965. g., a na liječenje redovitom hemodijalizom 31. prosinca 1966. g. Stvaranje baze podataka u koju su uneseni podatci od samog početka rada u našem Centru za dijalizu i transplantaciju, omogućuje nam danas redovito dobivanje mnoštva podataka i obimne retrogradne analize (16). Broj bolesnika s akutnim i kroničnim bubrežnim zatajenjem je sve veći. Danas se u našem Centru vrši oko 28000 dijalitičkih postupaka godišnje u bolesnika s akutnim i kroničnim bubrežnim zatajenjem. U Rijeci je blizu 200 bolesnika na liječenju

redovitom dijalizom, dok je ukupni broj bolesnika u RH oko 4.000, a širom svijeta preko 1,8 milijuna.

Indikacija za uvođenje nadomjesnog liječenja postavlja se sve ranije. Prema važećim smjernicama Europskog društva za dijalizu i transplantaciju (ERA-EDTA, prema engl. European Renal Association- European Dialysis and Transplant Association), pripremu bolesnika za dijalizu, odnosno transplantaciju bubrega i/ili gušterače treba započeti kad glomerularna filtracija padne ispod 30 ml/min i kada se ona unatoč primijenjenom liječenju dalje pogoršava. Nadomjesno liječenje uvodi se kod glomerularne filtracije ispod 15 ml/min ako uz to postoje znaci uremije, neprimjerena kontrola stanja hidracije ili krvnog tlaka i/ili pogoršanje stanja uhranjenosti bolesnika. Nadomjesno liječenje svakako treba započeti kada glomerularna filtracija padne ispod 10 ml/min/1.73 m^2, a u visoko-rizičnih bolesnika kao što su dijabetičari, potrebno je liječenje započeti ranije (17).

Ne postoje apsolutne kontraindikacije za liječenje dijalizom. Svi bolesnici, osim onih koji su bez mogućnosti bilo kakvog krvožilnog pristupa, mogu se liječiti hemodijalizom. Peritonejska dijaliza se preporuča kao prva metoda liječenja u bolesnika koji prihvaćaju ovu metodu liječenja i koji nemaju protivnosti, npr. opsežne ozljede trbuha, opsežne intraabdominalne priraslice, upalne procese i pothranjenost. Peritonejska dijaliza omogućuje duže očuvanje ostatne bubrežne funkcije, slobodniju prehranu i bolju kvalitetu života. Ona ima prednost u bolesnika sa srčanožilnim bolestima, šećernom bolesti i u starijih bolesnika, u kojih su učestalije komplikacije na liječenju hemodijalizom, a nezamjenjiva je u novorođenčadi i male djece. Ukoliko u bolesnika sa završnim stupnjem bubrežnog zatajenja nije moguće izvršiti presađivanje bubrega, najbolje preživljavanje postiže se započinjanjem nadomjesnog liječenja peritonejskom dijalizom i pravodobnim prijelazom na liječenje

hemodijalizom u slučaju gubitka ostatne bubrežne funkcije ili nedostatne doze dijalize (18).

1.1.2. Razvoj presađivanja bubrega

Prvo uspješno presađivanje bubrega izveo je 1954.g. Murray između genetski istovjetnih blizanaca bez imunosupresije (19). Medawar je 1940-ih godina otkrio i istraživao aktivno stečene (specifične) imunosne reakcije te pokazao da je za njihovo suzbijanje potrebno imunosupresivno liječenje (20,21). U početku se ozračivalo cijelo tijelo, Murray je 1960. g. prvi počeo primjenjivati 6-merkaptopurin, a ubrzo se počeo koristiti protuupalni steroid kortizon (22,23). Starzl i Marchioro su 1963. g. otkrili učinkovitost visokih doza prednizona u suzbijanju akutnih reakcija odbacivanja (24). Kortikosteroidi su u kombinaciji s azatioprinom, kemijskim derivatom 6-merkaptopurina, činili standardni imunosupresivni protokol tijekom 60-ih i 70-ih godina. Pronalazak antilimfocitnog globulina i ciklosporina, koje je Starzl prvi primijenio 1966. i 1980. g., omogućili su daljnji razvoj kliničke transplantacije organa (25,26). Ciklosporin je brzo postao temeljem imunosupresivnog protokola širom svijeta, jer je doveo do značajnog poboljšanja kvalitete života i preživljavanja bolesnika sa završnim stupnjem kroničnog bubrežnog zatajenja (27,28).

U naših bolesnika nove nade je pobudio početak presađivanja bubrega sa živog srodnika 30. siječnja 1971. u Rijeci, kao i prva uspješna transplantacija od umrle osobe 15. svibnja 1972. g. pod vodstvom prof. dr. sc. Vinka Frančiškovića (29-31). Prvi laboratorij za tipizaciju tkiva u Hrvatskoj utemeljen je u Rijeci u siječnju 1971.g. (32). Uhodano liječenje redovitom hemodijalizom u Rijeci bila je osnova na koju se mogla nadovezati transplantacija bubrega. Zbog duge tople ishemije u 91%

bolesnika javljala se odložena funkcija presađenog bubrega, uz čestu potrebu za dijalizom u prvim tjednima nakon transplantacije (33).

U početku je korištena trojna imunosupresivna terapija s azatioprinom, prednizonom i antilimfocitnim globulinom, a uvođenjem ciklosporina 1980-ih godina (u Rijeci 1984.g.), bilježi se signifikantno poboljšanje preživljavanja bolesnika i presadaka (34,35). Analizirajući učestalost osnovnih bolesti koje su dovele do bubrežnog zatajenja u bolesnika podvrgnutih presađivanju bubrega, uočeno je značajno smanjenje zastupljenosti kroničnog glomerulonefritisa (16). Bolesnici s dijabetičkom nefropatijom pojavljuju se u drugom petogodišnjem razdoblju transplantacijske aktivnosti u našem centru, uz tendenciju stalnog porasta. Prvo presađivanje bubrega u bolesnika sa šećernom bolesti izvršeno je u Rijeci 1976. g., a prva kombinirana presađivanja bubrega i gušterače izvela je riječka ekipa krajem 1993. g. na čelu s prof. dr. sc. Petrom Orlićem (36,37).

Tijekom 1990-ih godina pojavili su se noviji imunosupresivni lijekovi takrolimus, mikofenolat mofetil, rapamicin i monoklonska protutijela protiv interleukin-2 receptora (IL-2R, CD25). Oni su ubrzo postali sastavni dio imunosupresivnih protokola koji su doveli do daljnjeg poboljšanja preživljavanja bolesnika i presatka. Presađivanje bubrega postala je čvrsto etablirana metoda i liječenje izbora za bolesnike s kroničnim završnim bubrežnim zatajenjem, a u bolesnika koji dodatno boluju od šećerne bolesti tipa 1 to je kombinirano presađivanje bubrega i gušterače. Presađivanje organa omogućava bolju kvalitetu života i dulji očekivani životni vijek, nego što je to moguće ostvariti dijalizom. Životna dob bolesnika na liječenju dijalizom i bolesnika podvrgnutih presađivanju bubrega neprestano se povećava (16,38). Bolesnike treba temeljito pripremiti za liječenje

transplantacijom i isključiti postojanje protivnosti, prvenstveno uznapredovalih srčanožilnih bolesti i žarišta infekcije.

Od sveukupno preko 4000 bolesnika na liječenju redovitom dijalizom u Republici Hrvatskoj 31. prosinca 2008. g., manje od 400 bolesnika bilo je prijavljeno na listu čekanja za presađivanje bubrega (slika 1). Unatoč tome što se bilježi stalni porast broja presađivanja, broj dobivenih organa nije dostatan da pokrije potrebe (slike 2,3). U RH tijekom 2008. g. učinjeno je 158 presađivanja bubrega, od toga 149 bubrega od umrle osobe, 14 kombiniranih presađivanja gušterače i bubrega, i u jednog primatelja presađivanje bubrega umrle osobe u paru (39,40).

Slika 1: Broj bolesnika na dijalizi i listi čekanja za presađivanje bubrega u RH (39,40)

Slika 2: Presađivanje bubrega u RH (39,40)

Slika 3: Broj bolesnika na dijalizi, na listi čekanja i broj presađivanja bubrega u RH (39,40)

1.2. Presađivanje bubrega

1.2.1. Obrada i priprema primatelja bubrežnog presatka

Svi bolesnici sa završnim stupnjem bubrežnog zatajenja uzimaju se u obzir za liječenje presađivanjem bubrega, a dijabetičari tipa 1 za kombinirano presađivanje bubrega i gušterače. Ako ne postoje apsolutne protivnosti za presađivanje bubrega, bolesnika treba upoznati s prednostima, ali i rizicima presađivanja organa i primjene imunosupresivnih lijekova, te neophodnosti pridržavanja uputa i redovitih kontrolnih pregleda. Više od 20% primatelja bubrežnog presatka ne pridržava se uputa dobivenih od medicinskog osoblja i ne uzima sve lijekove u preporučenoj dozi, što je jedan od vodećih uzroka odbacivanja organa (41-43).

Prije prijavljivanja na listu čekanja za presađivanje organa, potencijalnog primatelja treba temeljito ispitati i pripremiti, odnosno primjereno liječiti prateća oboljenja koja bi mogla utjecati na njegovo preživljavanje ili na funkciju presatka. Potrebna je pravilna procjena kliničkog stanja bolesnika s obzirom na osnovnu bubrežnu bolest i njezine komplikacije. Neophodno je izvršiti cijeli niz pretraga s ciljem otkrivanja i liječenja prvenstveno infektivnih žarišta, srčanožilnih ili zloćudnih bolesti. Posebno rizične skupine čine bolesnici sa srčanožilnim bolestima i dijabetičari. Sva stanja koja zahtijevaju kirurško liječenje (npr. koronarna bolest srca, bolest srčanih zalistaka, suženje vratnih arterija koje opskrbljuju mozak ili suženje arterija koje dovode krv u noge) treba zbrinuti prije podvrgavanja bolesnika presađivanju bubrega. Infektivna žarišta treba izliječiti, jer primjena imunosupresije može ugroziti život bolesnika. Postoji nekoliko apsolutnih protivnosti za presađivanje bubrega: povišena tjelesna temperatura, aktivna infekcija i zloćudna bolest s kratkim očekivanim trajanjem života (43-47).

Nakon temeljitog pregleda bolesnika, laboratorijsko-instrumentalnih ispitivanja, isključenja protivnosti te dobivanja potpisanog informiranog pristanka bolesnika za liječenje presađivanjem organa, pristupa se završnim pretragama. One uključuju tipizaciju tkiva tj. određivanje leukocitnih antigena, i traženje protutijela u krvi bolesnika (engl. screening) koja ukazuju na raniji dodir bolesnika s leukocitnim antigenima i koja bi mogla uzrokovati odbacivanje presatka. Bolesnik koji nema živog darivatelja (najčešće uža rodbina, supružnik) prijavljuje se na nacionalnu listu čekanja za presađivanje bubrega od umrle osobe. Nakon toga potrebni su redoviti kontrolni pregledi radi otkrivanja mogućih novonastalih protivnosti za liječenje presađivanjem organa te poduzimanje primjerenog liječenja u svrhu njihovog otklanjanja. Za to vrijeme bolesnika treba privremeno odjaviti s liste čekanja za presađivanje.

Neposredno prije presađivanja bubrega od živog darivatelja ili umrle osobe, bolesniku se uzima uzorak krvi za križnu reakciju (engl. cross-match) s limfocitima darivatelja. Ovom metodom može se utvrditi postojanje protutijela u krvi primatelja, koja bi mogla dovesti do naglog i nepovratnog odbacivanja presatka. Kod poziva za presađivanje bubrega od umrle osobe, za izvođenje križne reakcije koriste se limfociti izolirani iz limfnog čvora ili slezene. Za to vrijeme provjerava se zdravstveno stanje bolesnika, obavljaju se hitne pretrage i priprema za kirurški zahvat. Ako je križna reakcija pozitivna ili se utvrde protivnosti za presađivanje organa, bolesnika se mora odbiti i presadak dodijeliti drugom primatelju. Ako je križna reakcija negativna, primjenjuje se početna doza lijekova protiv odbacivanja presatka i bolesnik se podvrgava kirurškom zahvatu - implantaciji organa. Kod presađivanja bubrega od živog darivatelja imunosupresija se uvodi dva do tri dana ranije. Nakon presađivanja

bolesnik mora svakodnevno i trajno uzimati lijekove za suzbijanje odbacivanja organa.

1.2.2. Darivatelji organa

Darivatelji organa mogu biti žive ili umrle osobe. Uvjeti za uzimanje i presađivanje organa utvrđeni su u RH „Zakonom o uzimanju i presađivanju dijelova ljudskog tijela u svrhu liječenja“ (48). Sigurno utvrđivanje smrti umrlih darivatelja organa, prema medicinskim kriterijima i na propisan način, preduvjet je za presađivanje organa. Smrt mogućeg darivatelja organa utvrđuje povjerenstvo zdravstvene ustanove, sastavljeno od najmanje tri liječnika, prema pravilniku o „pobližim medicinskim kriterijima te načinu i postupku utvrđivanja smrti osobe kojoj se dijelovi tijela mogu uzimati radi presađivanja“ (49). Dijelovi tijela smiju se uzeti radi presađivanja samo ako se darivatelj za života nije tome u pisanom obliku protivio. U našoj ustanovi i Republici Hrvatskoj uobičajeno je da se obitelj upozna s namjerom uzimanja organa za presađivanje te da se uvaži njezino moguće protivljenje. Uzeti dijelovi tijela dodjeljuju se, vodeći računa o njihovoj pravičnoj dostupnosti, primateljima s nacionalne liste čekanja i u skladu s transparentnim, objektivnim i općeprihvaćenim medicinskim kriterijima (48).

Uzrok smrti je najčešće moždani udar ili teška ozljeda glave darivatelja organa. Visoka starosna dob nije prepreka za presađivanje organa, ako je on morfološki i funkcionalno uredan. Međutim, u mogućeg darivatelja organa mora biti isključena infekcija ili zloćudna bolest, jer se ona presatkom može prenijeti primatelju. Tim anesteziologa, kirurga i pratećeg medicinskog osoblja osigurava optimalne uvjete tijekom postupka darivanja i održavanja organa, kako bi se postigla što bolja kvaliteta i funkcija presatka. Glavnu prepreku većem broju presađivanja

predstavlja ograničen broj organa. Stoga se poseže i za tzv. darivateljima prema proširenim kriterijima (engl. expanded criteria donors) ili marginalnim darivateljima, šireći dobne granice i koristeći bubrege od umrlih osoba koji su imali neke dodatne bolesti, npr. arterijsku hipertenziju ili šećernu bolest (50).

Prve transplantacije bubrega od umrlih darivatelja učinjene su uzimanjem organa od darivatelja nakon srčane smrti. Danas se razlikuju dvije kategorije darivatelja bubrega nakon srčane smrti (DACD, prema engl. donation after cardiac death) ili darivatelja s nekucajućim srcem (NHBD, prema engl. non-heart-beating donor). Prva kategorija su „nekontrolirani" DACD darivatelji, koji su nakon neuspjelih pokušaja oživljavanja ostali u asistoliji. Nakon proglašavanja njihove smrti brzo se postavljaju intravenski kateteri radi hlađenja organa, dok se ne obavijesti obitelj i dobije pristanak za donaciju organa. Drugu kategoriju čine „kontrolirani" DACD darivatelji, koji su u dubokoj komi s nepovratnim oštećenjem mozga u stanju „vegetacije" i ovisni o respiratoru, ali prema strogoj definiciji nisu moždano mrtvi. Kada obitelj s medicinskim osobljem donese odluku da će se ukinuti medicinska potpora, prekida se umjetna ventilacija i čeka prekid rada srca. Nakon definiranog razdoblja asistolije (obično 10 minuta) prelazi se na postupak eksplantacije organa (50,51).

Dijelovi tijela mogu se uzimati i od živih darivatelja radi presađivanja, što je također utvrđeno zakonom (48). Najčešće se od živih darivatelja presađuje bubreg, jer se radi o parnom organu. Nakon obvezatnih medicinskih pretraga i zahvata, radi procjene i smanjenja fizičkih i psihičkih rizika za zdravlje darivatelja, etičko povjerenstvo zdravstvene ustanove donosi odluku o uzimanju organa za presađivanje. Kako bi se spriječilo trgovanje organima, što je i zakonski zabranjeno, darivanje bubrega omogućuje se u slučaju kada se radi o bliskim rođacima, supružnicima ili

životnim partnerima, te osobama koje su s primateljem u vrlo bliskom odnosu. Darivatelji organa moraju biti stariji od osamnaest godina i sposobni za samostalno rasuđivanje. Nakon nepristranog savjetovanja i dobivanja iscrpnih informacija o prirodi, svrsi i tijeku zahvata, vjerojatnosti njegove uspješnosti i uobičajenim rizicima, darivatelj mora dati pisanu suglasnost koja mora biti izraz slobodne volje. Ovu suglasnost može u svako doba opozvati (48).

1.2.3. Značaj krvnih grupa i antigena tkivne podudarnosti

1.2.3.1. Značaj krvnih grupa

Antigeni AB0 krvnih grupa su jaki antigeni koji se nalaze na svim tkivima. Kod presađivanja bubrega nepodudarne krvne grupe obično dovode do ireverzibilnog hiperakutnog odbacivanja. Zato se kod presađivanja bubrega odabire primatelj koji je podudaran po AB0 krvnoj grupi, uz poštivanje transfuzijskih načela općeg darivatelja i općeg primatelja krvi, ali vodeći računa da se ne naruši prirodna ravnoteža na listi čekanja za presađivanje bubrega. U bolesnika na dijalizi česta je senzibilizacija na eritrocitne antigene (iregularna antieritrocitna protutijela). Nastajanje ovih protutijela može se smanjiti stvaranjem fenotipiziranog panela dobrovoljnih darivatelja krvi, kako bi se bolesnicima koji često zahtijevaju transfuziju davala krv koja je podudarna u što većem broju eritrocitnih krvnih grupa. Uvođenje liječenja eritropoetinom značajno je poboljšalo rezultate liječenja.

Učinjena su i uspješna presađivanja bubrega AB0 nepodudarnih darivatelja, ali uz prethodno odstranjenje izoaglutinina krvnih grupa plazmaferezom ili imunoadsorpcijom, a često i uz splenektomiju. Razvoj novijih imunosupresivnih lijekova omogućio je da se umjesto splenektomije primjenjuje kombinacija

plazmafereze, citomegalovirusnog hiperimunosnog globulina (CMVIG), intravenskih imunoglobulina (IVIG) i/ili anti-CD20 protutijela (rituksimab) (55,56).

U ispitivanju Collaborative Transplant Study (CTS) koje od 1982. g. vodi prof. dr. sc. G. Opelz, a u kojem se prati više od 300.000 presađivanja organa u transplantacijskim centrima širom svijeta (među njima i u Rijeci i Zagrebu), pokazalo se da kod AB0 nepodudarnih presađivanja bubrega ne dolazi uvijek do hiperakutnog odbacivanja bubrega (engl. non-responder). Oko 20% pripadnika bijele rase s krvnom grupom A ima podgrupu A_2. Takve osobe imaju manju količinu A antigena na endotelu presatka, što omogućava da se bubrezi darivatelja podgrupe A_2 sigurno presade primateljima krvne grupe 0 ili B s niskim prijeoperacijskim titrom anti-A izoaglutinina (32,53-57).

1.2.3.2. Značaj antigena tkivne podudarnosti

Brojne studije pokazuju da je dominantan utjecaj HLA podudarnosti (HLA= humani leukocitni antigeni) na preživljavanje bubrežnog presatka. Bez obzira da li se radi o presađivanju bubrega od živog ili umrlog darivatelja, učestalost ranih reakcija odbacivanja raste sa svakim nepodudarnim HLA antigenom između darivatelja i primatelja (58-61). Ta spoznaja dovela je do stvaranja nacionalnih lista čekanja radi presađivanja bubrega najpodudarnijem primatelju.

U polimorfnom HLA sustavu prevladavajući utjecaj na ishod presađivanja imaju HLA-DR antigeni, zatim slijede HLA-B antigeni, a najmanje su značajni HLA-A antigeni. Više od 30 godina se za određivanje leukocitnih antigena (tipizacija tkiva) koristila serološka metoda - test mikrocitotoksičnosti koji su 1964. g. razvili Terasaki i McClelland (62). Kod te metode korišteni antiserumi rijetko su monospecifični, te je za HLA tipiziranje potrebno koristiti nekoliko antiseruma. U novije vrijeme se za

HLA tipizaciju sve više koristi DNK metoda (DNK= deoksiribonukleinska kiselina), jer je znatno točnija (63). U KBC-u Rijeka danas se HLA-A, HLA-B i HLA-DR antigeni određuju DNK metodom.

Prije presađivanja bubrega potrebno je, pored HLA tipizacije primatelja i darivatelja, ispitati da li u primatelja postoje limfocitotoksična protutijela protiv leukocitnih antigena. Ispitivanje se najčešće izvodi testom limfocitotoksičnosti ovisne o komplementu na panelu limfocita darivatelja krvi dotične populacije stanovništva. Ovom pretragom (engl. screening) utvrđena protutijela nazivaju se panel-reaktivna protutijela (PRA, prema engl. panel reactive antibodies). Test se izvodi četiri puta godišnje kod svih bolesnika na listi čekanja za presađivanje bubrega. HLA protutijela mogu se stvoriti nakon transfuzije krvnih pripravaka, ranijeg presađivanja organa ili u žena tijekom trudnoće. Radi izbjegavanja senzibilizacije na leukocitne antigene (pojave citotoksičnih protutijela), u bolesnika na dijalizi anemiju treba liječiti eritropoetinom, a u slučaju potrebe za transfuzijom primijeniti filtriranu (deleukocitiranu) krv.

Kod planiranog presađivanja od živog darivatelja, tradicionalno su u evaluaciji parova korišteni testovi stanicama posredovane limfolize (CML, prema engl. cell-mediated lympholysis) i reakcija pomiješanih limfocita (MLR, prema engl. mixed lymphocyte reaction). Kod tih testova se stanice darivatelja inaktiviraju i zatim pomiješaju s limfocitima primatelja. Aloreaktivnost limfocita primatelja mjeri se stupnjem proliferacije stanica u toj reakciji. CML test mjeri reaktivnost citotoksičnih limfocita T prema nepodudarnim darivateljevim HLA antigenima razreda I (direktni put prepoznavanja antigena), a MLR test mjeri sposobnost primateljevih leukocita da reagiraju na razlike u HLA antigenima razreda II na leukocitima darivatelja (direktni i indirektni put prepoznavanja antigena). Ovi testovi su *in vitro* testiranje reakcija koje

bi se mogle dobiti nakon presađivanja bubrega, međutim njihova korisnost je ograničena jer oni često ne koreliraju s kliničkim odbacivanjem (64,65).

Križna proba, koju je razvio Terasaki, završna je provjera postojanja anti-donorskih protutijela u primatelja. Prisustvo citotoksičnih IgG anti-HLA protutijela protiv darivatelja je kontraindikacija za presađivanje bubrega (59).

1.2.4. Sustav dodjele organa

Podatci o darivatelju organa prosljeđuju se središnjem uredu za koordinaciju gdje se posebnim računalnim programom uspoređuju s podatcima svih primatelja na listi čekanja za presađivanje. U RH su se prije priključenja „Eurotransplantu“ (15.8.2007.g.) podatci slali u „Referalni centar za tipizaciju tkiva“. „Eurotransplant International Foundation“ nedohodovna je međunarodna organizacija sa sjedištem u Leidenu, u Nizozemskoj. Prvenstvena uloga ove organizacije je pospješivanje presađivanja organa posredovanjem i koordinacijom međunarodne razmjene organa na području koje obuhvaća oko 124 milijuna stanovnika. U Eurotransplantu surađuju transplantacijski centri, centri za tipizaciju tkiva i bolnice koje prijavljuju darivatelje organa u Austriji, Belgiji, Luksemburgu, Nizozemskoj, Njemačkoj, Sloveniji i Hrvatskoj. Organi se dodjeluju najboljem mogućem primatelju isključivo prema medicinskim kriterijima. Prilikom odabira daje se prednost primatelju koji je životno ugrožen (istrošene mogućnosti liječenja dijalizom) i senzibiliziranom bolesniku (prisustvo protutijela na leukocitne antigene), jer je mala vjerojatnost da će se naći bubrežni presadak na koji nije stvorio protutijela (66). Bodovni sustavi za dodjelu organa pokušavaju uravnotežiti pravednost dodjele organa s medicinskom koristi. Međutim, ponekad produžavanje hladne ishemije presatka (zbog dužeg transporta) uzrokuje slabije preživljavanje ili čak nemogućnost presađivanja organa.

1.3. Imunobiologija presađivanja

Osnovna zadaća imunosnog sustava, koji je sastavljen od različitih tipova stanica i mnoštva humoralnih čimbenika, jest obrana od prodora stranih antigena u organizam. Da bi ispunio ovu zaštitnu ulogu, imunosni sustav posjeduje mogućnost specifičnog razlikovanja „vlastitog“ od „stranog“, te pokretanja mehanizama specifične i nespecifične imunosne reakcije, usmjerene prema eliminacji stranog antigena (tablica 1).

Tablica 1: Osnovne funkcije imunosnog sustava, modificirano prema (67)

Imunosni sustav	**Prirođena imunost**	**Stečena imunost**
Funkcija	Prva obrana domaćina, brza, nespecifična, nenaučena	Obrana domaćina drugog reda, odgođena, antigen specifična, razvija se pamćenje
Ciljevi	Usmjereno na znakove opasnosti - obrasci prepoznavanja (npr. bakterijske ili virusne nukleinske kiseline, dijelovi stijenke bakterija)	Usmjereno na specifične strane imunogene (npr. epitopi, patogene bjelančevine)
Glavne stanice	Fagociti (makrofazi, polimorfonuklearne stanice) i stanice prirodne ubojice	Limfociti (T i B) i antigen predočne stanice
Glavni receptori	Ugljikovodični receptori, Toll-slični receptori	Receptori limfocita B i T, glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC)

1.3.1. Imunosna (transplantacijska) reakcija

Presadak se u pravilu uzima od genski neidentičnog darivatelja organa. Prepoznavanje tuđih antigena od strane primatelja uzrokuje transplantacijsku reakciju, odnosno imunosnu reakciju koja je usmjerena prvenstveno prema molekulama glavnog sustava tkivne podudarnosti MHC (prema engl. major histocompatibility complex). Ove molekule izražene su na površini stanica alogeničnog tkiva i proizvod su gena, smještenih na kratkom kraku šestog kromosoma, koji su dio kompleksa glavnog sustava tkivne podudarnosti MHC, u čovjeka HLA sustav. MHC molekule (MHC antigeni) su izrazito polimorfne, a njihovi geni se izražavaju kodominantno i nasljeđuju prema Mendelovim pravilima. Poligenizam se očituje u činjenici da je MHC genotip određen sa šest različitih genskih lokusa (šest različitih MHC molekula). Postoje MHC molekule razreda I (HLA-A, HLA-B i HLA-C) i molekule razreda II (HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR) koje se razlikuju po građi, mjestu izražaja i staničnom odjeljku iz kojeg primaju antigene peptide za predočavanje limfocitima T. U HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR lokusu postoje po dva gena za alfa i beta lanac molekule, s time da na HLA-DR lokusu gen za beta lanac može biti udvostručen. Prema tome, ukupno se može prepisati osam različitih MHC molekula razreda II, a ukoliko se uparuju proizvodi alfa i beta gena s različitih kromosoma, tada ukupni broj proizvoda doseže šesnaest. Polimorfizam se očituje u činjenici da se na svakom lokusu može pojaviti jedan od većeg broja alela iz populacije. Kada se uzmu u obzir samo proizvodi HLA-A, HLA-B i HLA-DR lokusa, koji se uobičajeno određuju kod presađivanja bubrega, poznato je 88 antigena koji su kodirani s više od 1000 različitih alela.

Citokini imaju važnu ulogu u modifikaciji izražaja MHC molekula. Tijekom imunosnog odgovora sve stanice presatka mogu izražavati MHC molekule razreda I, a

suputnički leukociti pored njih i MHC molekule razreda II. Međutim, primatelj može reagirati imunosnom reakcijom i protiv antigena sporednog sustava tkivne podudarnosti, polimorfnih staničnih bjelančevina koje nisu u MHC sustavu kodirane. Stoga je i kod presađivanja organa između MHC podudarnih jedinki, koje nisu jednojajčani blizanci, potrebno imunosupresivno liječenje kako ne bi došlo do odbacivanja presatka (64,68-71).

Tablica 2: Razlike MHC molekula razreda I i II, modificirano prema (71)

	MHC razreda I	**MHC razreda II**
Građa	MHC α lanac polimorfan, ß-2 mikroglobulin univerzalan	MHC α i ß lanci su polimorfni
Dužina peptida	Od 9 do11 aminokiselina	Obično od 14 do 17, no može biti i do 30 aminokiselina
Izvor antigena	Unutarstanični	Izvanstanični
Izražaj	Sve stanice s jezgrom	Limfociti B, makrofazi, dendritične stanice, epitelne stanice timusa i aktivirani limfociti T
Predočavanje antigena	$CD8^+$ limfocitima T	$CD4^+$ limfocitima T

1.3.2. Obilježja imunosne reakcije

Transplantacijska reakcija pokazuje sva svojstva normalne imunosne reakcije, a to su svojstvo specifičnosti, imunosne memorije, generalizirana je i antigenski specifična. Prepoznavanje stranih antigena na presatku od strane primateljevih limfocita ili protutijela dovodi do razaranja presatka. Imunosni odgovor određuju čimbenici darivatelja, prvenstveno izražaj HLA antigena i prisustvo antigen predočnih stanica u presatku, te primatelja u kojih je od izuzetne važnosti ranija senzibilizacija na AB0 i HLA antigene. Imunosna aloreakcija izuzetno je snažna i mobilizira veliki broj (do 10% svih klonova) limfocita T. Razlog tome je prepoznavanje stranih MHC molekula T limfocitnim receptorima pri čemu dolazi do aktivacije limfocita. Strane MHC molekule dovoljno su slične vlastitima, tako da T stanični receptori mogu reagirati s njima, a pri tome dovoljno različite da budu prepoznate kao promijenjene vlastite, tj. da sliče vlastitim MHC molekulama pri predočavanju stranog peptida. Stoga aloreakcija posredovana MHC molekulama može biti jača od ksenoreakcije preko ovih molekula, jer T stanični receptori primateljevih limfocita s ksenogeničnim MHC molekulama ne mogu reagirati ili vrlo teško reagiraju. Ipak, u slučaju ksenotransplantacije dolazi do vrlo brzog ili hiperakutnog odbacivanja organa, koje je u tom slučaju posredovano prirodnim protutijelima iz seruma primatelja (72-74).

1.3.2.1. Početni razvoj imunosne reakcije odbacivanja presatka

Oštećenje presatka tijekom postupka presađivanja dovodi do oslobađanja specifičnih upalnih medijatora kao što su citokini i kemokini. Oni mogu inducirati aktivaciju komplementa lektinskim putem, međutim puno važnija funkcija je poticanje upalne reakcije i aktivacija endotelnih stanica krvnih žila presatka. Ova aktivacija uzrokuje povećanje izražaja adhezijskih molekula na endotelnim stanicama

(E-selektin, ICAM-1, ICAM-2), koje se vežu za integrine (LFA-1, sialyl-Lewis) na leukocitima. Ovo dovodi do usporavanja i kotrljanja leukocita duž aktiviranih endotelnih stanica. Sekrecija kemokina privlači još više leukocita i uzrokuje njihovo čvrsto vezivanje na površinu endotelnih stanica. Time je stvoren preduvjet za dijapedezu i ekstravazaciju efektorskih leukocita u upalno promijenjeno tkivo. Izlaganje nekrotičnom tkivu presatka dovodi do daljnje aktivacije infiltrirajućih leukocita koji povećavaju lokalnu proizvodnju upalnih medijatora, uzrokujući dodatno oštećenje presatka. Antigen predočne stanice infiltriraju i fagocitiraju nekrotično alogenično tkivo, prerađuju ga i predočavaju na površini MHC molekula razreda II. Potom ove stanice, koje uključuju makrofage te dendritične stanice primatelja i darivatelja, migriraju u drenažna sekundarna limfatična tkiva (regionalne limfne čvorove), gdje aktiviraju aloreaktivne djevičanske limfocite T. Aktivirani limfociti T umnožavaju se i sazrijevaju u aloreaktivne zrele limfocite T koji se vraćaju u presadak i pokreću proces odbacivanja. (69-71,75,76).

1.3.2.2. Prepoznavanje aloantigena

Primateljevi limfociti mogu prepoznati prazne (nativne) alogenične MHC molekule razreda I i II, što se naziva izravnim prepoznavanjem. Prepoznavanje ovih davateljevih antigena prerađenih u primateljevim predočnim stanicama (fagocitne stanice ili dendritične stanice) i predočenih limfocitima T s pomoću primateljevih molekula MHC razreda II, nazivamo neizravnim prepoznavanjem. Pored toga, limfociti mogu prepoznati i druge prerađene aloantigene, koji pripadaju sporednom sustavu tkivne podudarnosti, u okviru vlastitih ili stranih MHC molekula na vlastitim ili stranim predočnim stanicama. Postoje naznake da ovi aloantigeni mogu biti uzrokom kroničnog odbacivanja.

Prvi strani antigeni koji dolaze u dodir s primateljevim limfocitima T su endotelne stanice presatka koje, kada se aktiviraju, mogu dodatno izražavati MHC molekule razreda II. Stoga je endotelitis ili vaskulitis jedan od pokazatelja akutnog odbacivanja.

Među suputničkim leukocitima koji dolaze s presatkom, najvažnije su antigen predočne stanice, a među njima dendritične stanice, koje snažno izražavaju oba razreda MHC molekula, kao i druge molekule koje su neophodne za aktivaciju limfocita T (kostimulacijske molekule). Budući da prenesene davateljeve predočne stanice nose i MHC molekule razreda II, one mogu davateljeve ili primateljeve prerađene peptide vezati i prenijeti iz presatka u regionalne limfne čvorove. Tamo podražuju pomoćničke limfocite T ($CD4^+$), koji nose komplementarni specifični receptor. Stoga, dendritične stanice mogu stimulirati obje izvršne podvrste limfocita T (pomoćničke i citotoksične stanice), koji infiltriraju presadak. Zbog velikog migracijskog potencijala, mogu se udomljavati u limfatičkim tkivima primatelja, gdje mogu pojačavati imunosni odgovor novačenjem većeg broja specifičnih limfocitnih klonova. Učinak davateljevih suputničkih leukocita je prolazan, jer oni nestaju iz presatka za nekoliko dana. Njihovo odstranjenje prije presađivanja produžava preživljavanje presatka (69-71,74,77).

1.3.2.3. Aktivacija limfocita T (signal 1)

Transplantacijsku reakciju pokreće međudjelovanje specifičnog receptora limfocita T s peptidnim antigenom predočenim u okviru MHC molekule na membrani antigen predočnih stanica. T stanični receptor je heterodimer kojega čine dva polipeptida lanca, α i ß lanac, koji imaju promjenjive i konstantne domene. Druga opisana podvrsta heterodimernog T staničnog receptora građena je od γ i δ lanaca, no

nije dokazano da je ova podvrsta limfocita T značajna u reakcijama na alogeni presadak. T stanični receptori na površini limfocita T povezani su s CD3 kompleksom, sastavljenim od više polipeptidnih lanaca, koji su značajni za stabilnost izražaja T staničnog receptora na membrani limfocita T te za prijenos signala u unutrašnjost stanice. Signali s površine limfocita T prenose se brojnim mehanizmima transmembranskog prijenosa u staničnu jezgru, gdje se modificira izražaj gena koji sudjeluju u regulaciji staničnih funkcija. Aktivacija putem T staničnog receptora potiče fosforilaciju receptorskih peptida, kao što su ζ lanci i druge adaptorske molekule koje se povezuju s receptorom. Ova fosforilacija aktivira različite stanične biokemijske puteve, uključujući kalcineurinski put, put protein kinaze C (PKC) te puteve koji uključuju Ras- i Rac-mitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze.

Većina zrelih limfocita T nosi CD4 ili CD8 molekulu na staničnoj membrani. CD4 molekule obilježavaju pomoćničke limfocite T i sudjeluju u reakcijama s MHC molekulama razreda II, dok CD8 molekule obilježavaju citotoksične limfocite T i reagiraju s MHC molekulama razreda I. Međutim, ova podjela nije stroga i postoje preklapanja. Iznimno $CD4^+$ limfociti T mogu pokazivati citolitička svojstva, a $CD8^+$ limfociti T proizvoditi regulacijske citokine koji su inače svojstveni $CD4^+$ stanicama. Smatra se da $CD4^+$ limfociti T posreduju prepoznavanje presadka, pojačavaju i koordiniraju imunosni odgovor te osiguravaju pomoć efektorskim stanicama.

Nakon aktivacije, limfociti T proizvode razne citokine koji reguliraju imunosni odgovor. Uz trajnu antigensku stimulaciju, limfociti T mogu se diferencirati u pomoćničke limfocite T tipa 1 (Th1 stanice, prema engl. T helper) ili tipa 2 (Th2 stanice). Pomoćnički limfociti T tipa 1 izlučuju citokine kao što su interleukin 2 (IL-2), interferon γ (INF-γ) i čimbenik tumorske nekroze alfa (TNF-α). U začetku ovog tipa odgovora sudjeluje i IL-12, koji se ubraja u Th1 profil iako nije limfocitni citokin,

nego ga proizvode antigen predočne stanice (dendritične stanice i makrofagi). Nabrojeni citokini potiču reakcije odgođenog odgovora preosjetljivosti i citotoksičnu aktivnost, što spada u reakcije stanične imunosti. S druge strane, pomoćnički limfociti T tipa 2, lučeći citokine IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13, potiču humoralni imunosni odgovor, koji obuhvaća proizvodnju opsonizirajućih i komplement vežućih protutijela IgG te aktivaciju eozinofila, proizvodnju i lučenje protutijela razreda IgE (69-71,75,77-79).

1.3.2.4. Kostimulacija limfocita T (signal 2)

Drugi neophodni signal za aktivaciju limfocita T je međudjelovanje kostimulacijskih receptora limfocita T s kostimulacijskim ligandima na površini antigen predočne stanice. Ovo međudjelovanje pojačava vezivanje limfocita T za antigen predočnu stanicu. Među adhezijskim molekulama koje sudjeluju u aktivaciji limfocita T, važnu ulogu u stabilizaciji međustanične veze igraju integrini, osobito LFA-1 na limfocitima T, koji se veže za molekule ICAM na antigen predočnim stanicama. Dodatno učvršćenje staničnih veza s kombinacijama adhezijskih molekulskih parova, kao što su ICAM1-VLA4 ili CD2-CD48/CD59, te drugih akcesornih molekula, dovodi do stvaranja tzv. imunosne sinapse.

Otkriveno je više načina kostimulacije limfocita T, među kojima je najvažnije međudjelovanje T limfocitnog CD28 s ligandima na antigen predočnoj stanici CD80 (B7-1) ili CD86 (B7-2). Izražaj ovih liganda pojačava aktivacija antigen predočnih stanica brojnim upalnim poticajima, uključujući infekciju i citokine. Anergiju limfocita T i apoptozu, koja može nastupiti kada postoji samo prvi signal preko specifičnog receptora limfocita T i CD3 kompleksa, sprječava signal preko CD28 molekule.

Osim ovog kostimulacijskog ili aktivacijskog signala, od velikog je značaja inhibicijski signal koji nastaje međudjelovanjem antigena citotoksičnih limfocita T 4 (CTLA4, prema engl. cytotoxic T lymphocyte antigen 4) s ligandima CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2). Za razliku od CD28 kojeg izražavaju mirujući limfociti T i koji pridonosi aktivaciji, CTLA4 je izražen na površini aktiviranih stanica i njegovo vezivanje izaziva inhibiciju. Stoga je taj signal važan za ograničavanje imunosnog odgovora kojim se ne dozvoljava istovremena aktivacija jedne stanice s dva ili više različitih antigena.

Uloga kostimulacijske molekule CD40 na antigen predočnoj stanici i njezinog liganda CD154 (CD40L) na limfocitu T također je značajna u imunosnom odgovoru na presadak. CD154 (CD40L) izražava se rano na aktiviranim limfocitima T i njegovo vezivanje s kostimulacijskom molekulom CD40 neophodno je za aktivaciju limfocita B, dendritičnih stanica i monocita, a značajno pojačava izražaj CD80/86 (B7) molekula (69-71,75,80).

1.3.2.5. Limfociti B

Važnost limfocita B i protutijela u odbacivanju presatka najočitija je kod hiperakutnog odbacivanja, koje nastaje unutar 24 sata od presađivanja u bolesnika koji su ranije senzibilizirani na alogene HLA molekule. Uloga limfocita B u akutnom odbacivanju posredovanom stanicama još nije dovoljno razjašnjena. Neke epizode akutnog odbacivanja imaju i humoralnu komponentu, što se može dokazati bojanjem C4d komponente komplementa u bioptatu.

Svaki klon djevičanskih limfocita B izražava jedinstveni antigen-specifični B stanični receptor. Tijekom aktivacije limfocita B, ovi receptori prepoznaju antigene alogeničnog presatka, internaliziraju ih, prerađuju i konačno predočavaju putem MHC

molekula razreda II na svojoj površini. Pored toga za razvoj B limfocitnog odgovora potrebno je međudjelovanje limfocita B i prethodno aktiviranih $CD4^+$ pomoćničkih limfocita T podvrste Th2, koji prepoznavaju kompleks antigen/MHC molekula razreda II i luče citokine potrebne za sazrijevanje i proliferaciju limfocita B (69-71,75,80-83).

1.3.2.6. Klonalna ekspanzija i dozrijevanje limfocita

Potpuna aktivacija limfocita (signal 1 i 2) manifestira se izražajem IL-2R i lučenjem IL-2, što je neophodno za ulazak limfocita u stanični diobeni ciklus. Potom slijedi klonalna ekspanzija limfocita T koju, pored ostalih čimbenika rasta i diferencijacije, prvenstveno vodi IL-2. Dozrijevanjem odgovora limfocita T postavljene su osnove za stanično odbacivanje presatka. Limfociti B nakon aktivacije i proliferacije sazrijevaju u plazma stanice koje proizvode aloreaktivna protutijela, koja reagiraju s površinskim molekulama alogeničnih endotelnih stanica (69-71,75,76,80,84).

1.3.2.7. Efektorski mehanizmi

$CD4^+$ stanice nakon prepoznavanja stranih MHC molekula razreda II igraju važnu ulogu u regulaciji efektorskih mehanizama. Početni upalni odgovor koji nastaje zbog oštećenja tkiva tijekom postupka presađivanja, pripada prirođenoj imunosti i nije ovisan o antigenu. Taj odgovor posreduju neutrofili i stanice monocitnog reda, uključujući makrofage i dendritične stanice. Antigen-specifična aktivacija $CD4^+$ stanica dovodi do stvaranja efektorskog fenotipa Th1 koji se očituje u izražaju specifičnih molekula na staničnoj površini i proizvodnji citokina, koji potiču monocite. Ova suradnja između $CD4^+$ stanica i monocita izaziva odgovor odgođenog

tipa preosjetljivosti i igra značajnu ulogu u razaranju presatka, dok aktivacija makrofaga uzrokuje oštećenje tkiva i fibrozu.

Akutno stanično odbacivanje presatka je najčešći oblik rane reakcije odbacivanja nakon presađivanja bubrega. Može zahvatiti epitelne stanice tubula ili stanice vaskularnog endotela. Aktivacija $CD4^+$ stanica Th1 profila i proizvodnja citokina (npr. IL-2, IFN-γ, TNF-β) također potiče aktivaciju i umnažanje citotoksičnih $CD8^+$ limfocita T i stanica prirodnih ubojica (NK, prema engl. natural killer). Aktivirani citotoksični limfociti $CD8^+$ putuju u presadak i ubrzo ga uništavaju jer prepoznaju davateljeve antigene MHC razreda I. Aktivirani citotoksični limfociti T na površini izražavaju CD178 (fas ligand, Fas-L), koji reagira s CD95 (fas) izraženim na ciljnoj stanici presatka, što dovodi do inducirane apoptoze stanice. Dodatno citotoksične efektorske stanice otpuštaju citolitičke bjelančevine kao što je perforin, koji se veže na površinu membrane ciljne stanice. Djelovanje perforina omogućuje prolazak serin proteaza, kao što je granzim B, u citoplazmu ciljnih stanica, koji nakon internalizacije aktivira mehanizme apoptoze.

Akutno humoralno odbacivanje započinje vezivanjem specifičnog antigena od strane receptora limfocita B (membranskog imunoglobulina), nakon čega dolazi do umnažanja limfocita B i dozrijevanja u plazma stanice. Za ovaj proces neophodni su citokini koje proizvode $CD4^+$ stanice Th2 profila i koji stimuliraju limfocite B. Diferencijacijom i proliferacijom limfocita B nastaju plazma stanice, koje proizvode topljive imunoglobuline, protutijela koja se mogu vezati za endotel alogeničnih stanica. Izlučena protutijela mogu uzrokovati oštećenje stanica pomoću nekoliko različitih izvršnih mehanizama. Jedan od najvažnijih mehanizama je izravna aktivacija komplementa, koja uslijedi nakon što specifična protutijela protiv tkiva darivatelja opsoniraju endotelne stanice. Tada se pokreće klasični put aktivacije

komplementa u kojem se prve aktiviraju katalitičke podjedinice C1 kompleksa. One potiču aktivaciju sljedećih komponenti komplementa u nizu, uključujući C4b, koji je kovalentno vezan za površinu stanične membrane. Nakon inaktivacije C4b, zaostaje C4d na površini endotelne stanice, što se može dokazati imunohistokemijski, a označava aktivno akutno humoralno odbacivanje. Kaskadni aktivacijski slijed tijekom humoralnog odbacivanja završava stvaranjem citotoksičnog kompleksa koji napada membranu (MAC, prema engl. membrane attacking complex), a koji izaziva smrt endotelnih stanica apoptozom. Pored toga, protutijela mogu oštetiti ciljna tkiva i posredstvom reakcije stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC, prema engl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity). Ovu citotoksičnost ovisnu o protutijelima prvenstveno posreduju stanice NK (69-71,75,76,79,81-85).

1.4. Imunosupresivno liječenje

Cilj imunosupresivnog liječenja je smanjenje neželjene imunosne aktivnosti. Međutim, primjenu imunosupresije prate i komplikacije kao što su infekcije, tumori, metabolički poremećaji, arterijska hipertenzija te druge nuspojave liječenja. Imunosupresivni agensi mogu djelovati na različitim razinama aktivacije i proliferacije limfocita. Oni mogu ometati prijenos signala nakon međudjelovanja T staničnog receptora s antigen predočnim stanicama, kao i s provođenjem signala putem CD3 kompleksa (signal 1). Također, ovi lijekovi mogu djelovati na kostimulacijski signal koji nije antigen-specifičan i koji nastaje međudjelovanjem CD80/86 (B7) na antigen predočnoj stanici s CD28 molekulom na limfocitu T (signal 2). Tijekom imunosne reakcije ova dva signala aktiviraju unutarstanične mehanizme, koji dovode do izražaja IL-2 i drugih citokina te IL-2R. Stimulacija IL-2R uzrokuje aktivaciju mTOR (prema engl. mammalian target of rapamycin), što daje signal 3, koji pokreće staničnu proliferaciju, a koja se također može suzbiti primjenom imunosupresije (86-88).

Slika 4: Ciljevi imunosupresivnih lijekova, prema (90)

1.4.1. Imunosupresivni lijekovi

1.4.1.1. Kortikosteroidi

Kortikosteroidi su bili prvi lijekovi koji su korišteni za liječenje transplantacijske reakcije nakon presađivanja bubrega. Kako većina stanica u citoplazmi ima glukokortikoidne receptore, na brojnim organskim sustavima javljaju se neželjeni učinci ovih lijekova. Iz tog razloga nastoji se u današnje vrijeme izbjeći, smanjiti dozu ili ranije obustaviti liječenje kortikosteroidima.

Ovi lijekovi djeluju na specifičnu imunost blokirajući ekspresiju gena za citokine i citokinske receptore koji posreduju funkcije antigen predočnih stanica i limfocita T, a pored toga svojim protuupalnim učincima djeluju i na nespecifičnu imunost. Naročito snažno suprimiraju specifičnu imunost inhibicijom funkcije dendritičnih stanica, koje su najvažnije antigen predočne stanice. Zbog hidrofobnosti kortikosteroidi mogu difundirati kroz stanicu, gdje se vežu za citoplazmatske receptore povezane s bjelančevinom toplinskog šoka (engl. heat shock protein). Pri tome dolazi do odvajanja ove bjelančevine od receptora i kompleks steroida s receptorom putuje u jezgru, gdje se veže za sljedove DNK, koji se nazivaju elementi glukokortikoidnog odgovora (GREs, prema engl. glucocorticoid response elements). Ovime se vjerojatno inhibira prepisivanje gena za citokine. Kortikosteroidi također inhibiraju translokaciju jezgrinog čimbenika prepisivanja κ-B (NF κ-B, prema engl. nuclear factor κ-B), koji ima važnu ulogu u poticanju gena koji kodiraju brojne citokine. Kortikosteroidi inhibiraju izražaj IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF-α i INF-γ. Posljedica toga je inhibicija svih stupnjeva aktivacije limfocita T. Vrućica koja često prati akutno odbacivanje, a posljedica je oslobađanja citokina, brzo prestaje nakon primjene pulsnih doza kortikosteroida. Kortikosteroidi uzrokuju limfopeniju preraspodjelom limfocita iz krvožilnog sustava natrag u limfno tkivo i izravnim antilimfocitnim djelovanjem, budući da ovi lijekovi uzrokuju progamiranu staničnu smrt limfocita T (apoptozu). Pored toga kortikosteroidi ometaju migraciju monocita u upalno promijenjeno područje i njihovu dijapedezu tako da blokiraju sintezu, oslobađanje i djelovanje brojnih kemokina, vazodilatacijskih čimbenika i čimbenika koji povećavaju propusnost krvnih žila. Tijekom liječenja visokim dozama kortikosteroida, ukupni broj leukocita u perifernoj krvi može višestruko narasti.

Snažno imunosupresivno i protuupalno djelovanje kortikosteroida uz njihovo hormonalno djelovanje uzrokuje brojne neželjene učinke. Među važnijima su smanjena otpornost na infekcije, arterijska hipertenzija, hiperlipidemija, intolerancija glukoze, usporeno cijeljenje rana, ometanje rasta, osteonekroza, osteoporoza, razvoj mrene te kozmetičke i psihopatološke promjene. Znatne individualne razlike u zastupljenosti glukokortikoidnih receptora u tkivima te u metabolizmu kortikosteroida uzrokuju različit odgovor na primjenu ovih lijekova. Učestalost i jačina ovih neželjenih djelovanja značajno se smanjuju uz niže doze kortikosteroida.

Najčešće se koriste prednizolon i njegov 11-keto metabolit prednizon u obliku tableta, a metilprednizolon kao intravenski pripravak. Prednizolon je najaktivniji cirkulirajući imunosupresivni kortikosteroid. Poluživot ovih lijekova traje nekoliko sati, ali njihov učinak na suzbijanje proizvodnje limfokina je produžen (oko 24 sata). Kortikosteroidi se razgrađuju u jetri mikrosomalnim enzimskim sustavima. Stoga lijekovi koji induciraju ove enzime smanjuju razinu kortikosteroida u plazmi (npr. barbiturati), dok ju oralni kontraceptivi i ketokonazol povećavaju (86-90).

1.4.1.2. Inhibitori kalcineurina ciklosporin i takrolimus

Ciklosporin (ciklosporin A) je mali ciklički polipeptid gljivičnog podrijetla, koji se sastoji od 11 aminokiselina. Takrolimus (FK506) je makrolidna antibiotska tvar izolirana iz Streptomyces tsukubaensis. Ciklosporin A i takrolimus inhibiraju kalcineurinski put prijenosa signala u stanici, što smanjuje aktivaciju limfocita.

Nakon vezivanja antigena za T stanični receptor, fosforilacija ZAP-70 (ζ-vezana bjelančevina, prema engl. zeta associated protein) uzrokuje fosforilaciju fosfolipaze C γ 1, koja hidrolizira membranski fosfolipid fosfatidilinozitol 4,5 bifosfonat (PIP_2) u inozitol 1,4,5-trifosfat (IP_3) i diacilglicerol (DAG). IP_3 dovodi do

porasta koncentracije kalcija u stanici. Kalcij vezivanjem za kalmodulin tvori kompleks koji aktivira nekoliko enzima, uključujući fosfatazu kalcineurin. Kalcineurin defosforilira određene regulacijske bjelančevine u jezgri, npr. NFAT (prema engl. nuclear factor of activated T cells), i olakšava njihov prolaz kroz jezgrinu membranu. Ciklosporin vezivanjem za citoplazmatski receptor ciklofilin i takrolimus vezivanjem za citoplazmatski receptor FKBP (prema engl. FK binding protein), tvore kompleks koji inhibira aktivnost kalcineurina. Inhibicija kalcineurina ometa izražaj nekoliko značajnih gena citokina koji pospješuju aktivaciju limfocita T, uključujući one za IL-2, IL-4, IFN-γ i TNF-α. Također je ometano prepisivanje drugih gena, kao što su geni za CD154 (CD40L) i protoonkogena H-ras i c-myc. Posljedica tih učinaka je smanjenje proizvodnje citokina i umnažanja limfocita. Ciklosporin dodatno pojačava izražaj TGF-β (prema engl. transforming growth factor-β), koji također inhibira IL-2 i stvaranje citotoksičnih limfocita T. Postoji mogućnost da je TGF-β odgovoran za razvoj intersticijske fibroze, što je značajna karakteristika nefrotoksičnosti inhibitora kalcineurina, a također se povezuje s umnažanjem tumorskih stanica.

Od 1996. se, umjesto starijeg pripravka lijeka, zbog bolje apsorpcije većinom koristi mikroemulzija ciklosporina, koja postoji u obliku otopine ili mekih gelatinoznih kapsula, a rjeđe se primjenjuje intravenski pripravak. Takrolimus također postoji u obliku kapsula i intravenskog pripravka. Poluvrijeme eliminacije inhibitora kalcineurina je oko osam sati. Oni se metaboliziraju u jetri u brojne metabolite koji mogu biti aktivni i nefrotoksični, a izlučuju se putem žuči uz neznatno bubrežno izlučivanje.

Aktivnost kalcineurina je kod terapijskih nivoa ciklosporina i takrolimusa smanjena na 50%, što omogućava jakim signalima da potaknu imunosni odgovor koji

može zaštititi domaćina. Inhibitori kalcineurina ulaze u interakcije s brojnim lijekovima koji su u širokoj upotrebi, a koji također mogu utjecati na aktivnost P450 u jetri ili u crijevima. Pored toga inhibiraju MDR bjelančevinu (prema engl. multidrug resistance protein), što također dovodi do interakcije s drugim lijekovima. Radi adekvatnog doziranja potrebno je određivanje razine inhibitora kalcineurina u punoj krvi. Određivanje se vrši 12 sati nakon uzimanja lijeka (najniža koncentracija, engl. trough level), a kod ciklosporina preporuča se i određivanje dva sata nakon uzimanja lijeka (približna maksimalna koncentracija, engl. C2- monitoring). Uzorak krvi uzima se u epruvete s antikoagulansom EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina). Najspecifičnija i referentna metoda za određivanje nemetaboliziranog ciklosporina je metoda HPLC (prema engl. high performance liquid chromatography). Međutim, zbog skupoće ove metode i kompliciranog izvođenja, koriste se imunosni testovi s monoklonskim protutijelima na ciklosporin FPIA (prema engl. fluorescence polarization immunoassay) i EMIT (prema engl. enzyme-multiplied immunoassay technique). Ovi testovi križno reagiraju i s metabolitima ciklosporina, čime precjenjuju razinu ciklosporina za 45%, odnosno 15%. Za određivanje razine takrolimusa većinom se koristi test s monoklonskim protutijelima MEIA (prema engl. microparticle enzyme immunoassay).

Nefrotoksičnost je glavni nedostatak inhibitora kalcineurina. Reverzibilna vazokonstrikcija, koja je ovisna o dozi i koju inhibitori kalcineurina u bubrezima izazivaju prvenstveno na arterioli aferens, može se nakon presađivanja izraziti usporavanjem odgođenog oporavka presatka (akutna tubularna nekroza) ili akutnim reverzibilnim smanjenjem glomerularne filtracije (porast kreatinina). Kao posljedica dugotrajne primjene inhibitora kalcineurina razvija se kronična intersticijska fibroza, koja može biti mjestimična ili prugasta te povezana s oštećenjem arteriola.

Intersticijska fibroza može dovesti do kroničnog bubrežnog zatajenja sa smanjenjem glomerularne filtracije, koje može biti progresivno. Inhibitori kalcineurina mogu izazvati i akutnu mikrovaskularnu bolest, trombotičku mikroangiopatiju, koja može zahvatiti samo bubreg ili može biti sustavna bolest. Ovaj sindrom je sličan trombotičkoj trombocitopeničnoj purpuri (TPP).

Bubrežna vazokonstrikcija dovodi do smanjenog izlučivanja natrija sa sklonošću razvoja arterijske hipertenzije i zadržavanja tekućine. Inhibitori kalcineurina često izazivaju hiperkalijemiju, koja može biti povezana s blagom hiperkloremičkom acidozom. Također mogu izazvati hipomagnezijemiju ili hipokalcijemiju povećanim izlučivanjem ovih elektrolita te hiperuricemiju zbog smanjenog izlučivanja mokraćne kiseline mokraćom.

Druge značajne nuspojave ovih lijekova su promjene u testovima jetrene funkcije, hiperlipidemija, intolerancija glukoze ili dijabetes melitus, neurotoksičnost, kardiotoksičnost, poremećaji ili bolesti probavnog sustava (kolelitijaza, povraćanje, proljev), tromboembolija, hiperuricemija, giht, kozmetičke promjene (pojačana dlakavost ili gubitak kose, hiperplazija gingiva, ginekomastija), infekcije i malignitet (86-90).

1.4.1.3. Mikofenolat mofetil

Mikofenolat mofetil (MMF) se koristi od 1995. g. kod presađivanja organa. Proizvod je fermentacije različitih plijesni vrste Penicilliuma, a za razliku od azatioprina MMF selektivno djeluje na limfocite. U kombinaciji s ciklosporinom i prednizonom, MMF se pokazao efikasnijim od azatioprina u sprječavanju akutnog odbacivanja bubrežnog presatka od umrle osobe. Aktivna tvar MMF je mikofenolna kiselina (MFK), koja se sama koristi od 2004. g. (ERL-80, myfortic). Reverzibilnom

inhibicijom inozin monofosfat dehidrogenaze (IMPDH), MFK u aktiviranim limfocitima inhibira sintezu purina i stvaranje gvanozin nukleotida od inozina. Limfociti, za razliku od drugih stanica, nemaju rezervni put za proizvodnju gvanozin nukleotida od gvanina. MFK inhibira proliferaciju limfocita T u IL-2 ovisnom putu (blokada G_1 faze staničnog ciklusa).

MMF se koristi u obliku kapsula, a MFK u obliku želučanootpornih tableta. Dnevna doza od 2 g MMF odgovara 720 mg MFK. Vrlo rijetko se primjenjuje intravenozni preparat lijeka. Nakon peroralne primjene bioraspoloživost lijeka je 90%, a poluvrijeme eliminacije je 12 sati. Neželjene pojave javljaju se prvenstveno u probavnom sustavu, a mogu se javiti i leukopenija, anemija ili trombocitopenija, koje mogu zahtijevati promjenu doziranja lijeka. Korisno je određivanje razine lijeka u krvi. Ciklosporin snižava razinu MFK jer smanjuje njezinu enterohepatičnu recirkulaciju, a lijekovi kao što su antacidi, kolestiramin ili peroralna primjena željezo-sulfata smanjuju apsorpciju lijeka u crijevima (86-91).

1.4.1.4. Azatioprin

Antimetabolit azatioprin je imidazolski derivat 6-merkaptopurina. U imunosupresivnom liječenju standardno se dodavao ciklosporinu i kortikosteroidima. Danas se umjesto njega većinom koristi mikofenolat mofetil, jer je učinkovitiji u suzbijanju akutne reakcije odbacivanja i djeluje selektivno na limfocite. Azatioprin se ugrađuje u staničnu DNK i inhibira sintezu purinskih nukleotida te ometa sintezu i razgradnju RNK. Time inhibira replikaciju gena i posljedičnu aktivaciju limfocita T. Azatioprin ima široko supresivno djelovanje na mijelocitnu lozu tako da inhibira proliferaciju promijelocita u koštanoj srži, čime se smanjuje broj cirkulirajućih monocita koji su sposobni da dozriju u makrofage. Azatioprin snažno inhibira

primarni imunosni odgovor, ali nije učinkovit u liječenju krize odbacivanja. Najznačajnija neželjena djelovanja uključuju hematološke poremećaje, prvenstveno leukopeniju i trombocitopeniju, hepatitis i kolestazu, a rijetko upalu gušterače. Inhibicija ksantin oksidaze alopurinolom sprječava razgradnju azatioprina, što može dovesti do teške leukopenije i trombocitopenije (86-90).

1.4.1.5. „TOR“ inhibitori: sirolimus i everolimus

Sirolimus i everolimus inhibiraju ključnu regulacijsku kinazu u procesu stanične diobe TOR (cilj djelovanja rapamicina, prema engl. target of rapamycin). Sirolimus (rapamicin) je makrolidni antibiotik, po strukturi sličan takrolimusu, koji se koristi u kliničkoj transplantaciji od 1999. g. U početku je davan u kombinaciji s ciklosporinom i kortikosteroidima. Njegov derivat everolimus (RAD, prema engl. rapamycine-derivative) je hidrofilniji, ima kraći poluživot i veću bioraspoloživost.

Sirolimus i everolimus vežu se za FKBP, međutim ovaj kompleks ne inhibira kalcineurin nego bjelančevinu TOR, što sprječava učinak faktora rasta na aktivirane limfocite. Ovi lijekovi smanjuju proliferaciju hematopoetskih i nehematopoetskih stanica ovisnu o citokinima u G_1 i S fazi diobenog ciklusa. Mogu se primjenjivati zajedno s takrolimusom, jer postoji suvišak FKBP, zbog čega izostaje kompetitivna inhibicija.

Sirolimus se brzo resorbira iz probavnog sustava, a poluživot mu je prosječno 62 sata. Uz početnu dozu lijeka koja je tri puta veća od doze održavanja, brzo se postiže stalna koncentracija lijeka u krvi. Poluživot everolimusa je kraći, prosječno 23 sata. TOR inhibitori se uglavnom razgrađuju u jetri djelovanjem CYP3A i p-glikoproteina, dok im je bubrežno izlučivanje minimalno. U kombinaciji s ciklosporinom, koncentracija sirolimusa 12 sati nakon uzimanja lijeka (engl. trough

level) ispod 6 ng/dl (mjereno HPLC metodom) povezana je s većom učestalošću reakcije odbacivanja, dok koncentracija iznad 15 ng/dl češće dovodi do neželjenih djelovanja.

Inhibitori TOR-a i kalcineurina razgrađuju se istim enzimatskim sustavima. Kako ne bi došlo do izrazitog povećanja koncentracije sirolimusa u krvi i mogućih neželjenih djelovanja, preporuča se primjena sirolimusa četiri sata nakon jutarnje doze ciklosporina. Značajna su međudjelovanja sirolimusa s drugim lijekovima te je potrebno prilagoditi njihovu dozu. Kada se sirolimus primjenjuje zajedno s ciklosporinom, potrebne su niže doze ciklosporina. Mogući je jači nefrotoksični učinak, koji je nakon smanjenja doze reverzibilan. Toksičnim učinkom na bubrežne tubule, TOR inhibitori mogu izazvati hipokalijemiju i hipomagnezijemiju, što je posljedica njihovog pojačanog izlučivanja mokraćom. Drugi neželjeni učinci TOR inhibitora su usporeno cijeljenje rana, pojava limfokela, ulceracija u ustima te oligospermija. TOR inhibitori mogu usporiti oporavak od akutne tubularne nekroze i odgoditi uspostavu funkcije bubrežnog presatka. Kombinacija sirolimusa i takrolimusa može zbog tubularnog oštećenja, sličnog onome kod multiplog mijeloma, izazvati akutno bubrežno zatajenje s pojavom cilindara u mokraći. U više od polovine bolesnika na liječenju TOR inhibitorima razvija se hiperlipidemija, osobito kada se ovi lijekovi daju u kombinaciji s ciklosporinom. Zbog veće učestalosti upale pluća preporuča se profilaktička primjena kotrimoksazola u prvoj godini po presađivanju bubrega. TOR inhibitori također mogu uzrokovati reverzibilno smanjenje broja krvnih stanica, osobito trombocita. Učestalost malignoma i poslijetransplantacijske limfoproliferativne bolesti je niska i ne odstupa od uobičajenog, a opisuje se i antitumorsko djelovanje sirolimusa zbog inhibicije angiogeneze i prekida rasta malignih stanica u G_1 i S fazi staničnog diobenog ciklusa (86-90).

1.4.1.6. Poliklonska antilimfocitna protutijela

Antilimfocitni globulini primjenjuju se od 1970-ih godina u kliničkoj transplantaciji organa. Dobivaju se imunizacijom konja ili kunića humanim limfoidnim tkivom. Iz seruma imuniziranih životinja izolira se i pročišćava gama globulinska frakcija. Danas se većinom koriste pripravci Thymoglobuline® koji se dobiva imunizacijom kunića humanim timocitima, Atgam® kod kojeg se imuniziraju konji humanim timocitima te ATG- Fresenius® kod kojeg se koristi Jurkat stanična linija (T limfocitna leukemija) za imunizaciju kunića.

Intravenski imunoglobulini dobivaju se sakupljanjem ljudske plazme, a njihova primjena u liječenju kod presađivanja organa postaje sve češća (86-90).

1.4.1.6.1. Antilimfocitni globulini

Antilimfocitni globulini (ALG) sadrže citotoksična protutijela protiv velikog broja površinskih antigena limfocita T, NK i B stanica, adhezijskih molekula i kemokinskih receptora. Djelovanje je primarno posljedica deplecije limfocita T ($CD3^+$ za više od 50%) u krvi i limfatičkim organima, međutim točan mehanizam nije poznat. Limfopenija se razvija unutar 24 sata i perzistira nekoliko godina, a $CD8^+$ limfociti T oporavljaju se prije $CD4^+$ limfocita T. Na jačinu deplecije limfocita T u perifernim tkivima više utječe maksimalna razina lijeka nego kumulativna doza. ALG izazivaju imunomodulaciju i funkcionalnu alteraciju limfocita T, potiču nastanak $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ (Foxp3, prema engl. forkhead box protein 3) regulacijskih stanica T i mogu smanjiti staničnu infiltraciju kod reperfuzije organa i tijekom epizoda akutnog odbacivanja.

Doziranje antilimfocitnih globulina i trajanje liječenja ovise o načinu primjene i kombinaciji s drugim imunosupresivima. Poluvrijeme eliminacije ALG jako varira.

Praćenje se temelji na određivanju broja limfocita T u perifernoj krvi. Intraoperativna primjena ALG, prije reperfuzije, može smanjiti učestalost odgođenog preuzimanja funkcije presatka, međutim nije poznato da li oslobađanje citokina može pojačati reperfuzijsko oštećenje.

Uz konvencionalnu trojnu imunosupresivnu terapiju, koja obuhvaća inhibitor kalcineurina, mikofenolat mofetil (ili mikofenolnu kiselinu) i kortikosteroid, primjena ALG smanjuje učestalost akutnog odbacivanja presatka i omogućava odgođeno uvođenje inhibitora kalcineurina. ALG također pružaju imunosupresivnu zaštitu za modulaciju doze drugih imunosupresiva, liječenje s nižom dozom ili bez kortikosteroida te smanjenje doze inhibitora kalcineurina na minimum. ALG se primjenjuju uz konvencionalnu imunosupresivnu terapiju, osobito u bolesnika s najvećim rizikom za odbacivanje ili povećanim rizikom za odgođeno preuzimanje funkcije presatka. Oni smanjuju rizik od prolongirane tubularne nekroze i pojave kirurških komplikacija.

Bez antivirusne profilakse javlja se veća učestalost citomegalovirusne infekcije i BK viremije (vrsta poliomavirusa), a povećana je i učestalost karcinoma te poslijetransplantacijske limfoproliferativne bolesti. U bolesnika s niskim rizikom za akutno odbacivanje, liječenje ALG-ima nema prednosti pred konvencionalnom trojnom imunosupresivnom terapijom koja obuhvaća inhibitor kalcineurina, mikofenolat mofetil (ili mikofenolnu kiselinu) i kortikosteroid.

ALG se primjenjuju s fiziološkom otopinom ili 5%-tnom otopinom glukoze u sporoj infuziji u veliku venu tijekom nekoliko sati. Prije infuzije treba dati dnevnu dozu kortikosteroida, intravenski antihistaminik i antipiretik, jer tijekom primjene ALG, osobito nakon prve infuzije, često dolazi do pojave sindroma otpuštanja citokina. Ovaj sindrom je karakteriziran tresavicom, vrućicom, niskim krvnim tlakom,

ubrzanim radom srca, povraćanjem i nedostatkom zraka. K tome potrebna je zaštita od venske tromboze s heparinom te zaštita od virusnih i drugih oportunističkih infekcija. Na mjestu infuzije mogu se javiti znakovi tromboflebitisa. Rijetko se javljaju odgođene alergijske reakcije kao što je serumska bolest, a izuzetno neposredne ozbiljne alergijske reakcije u vidu anafilaksije. Tijekom prva dva dana, ali i po završetku liječenja, može se registrirati neutropenija i trombocitopenija, koje su nakon smanjenja doze lijeka reverzibilne. Ovisno o težini trombocitopenije i/ili leukopenije, preporuča se smanjenje doze ili ukidanje ALG (86-90).

1.4.1.6.2. Intravenski imunoglobulini

Intravenski imunoglobulini (IVIG) dobivaju se skupljanjem plazme od nekoliko tisuća darivatelja krvi. Mogu biti specifični, npr. citomegalovirusni hiperimuni globulin (CMVIG), ili nespecifični (IVIG). Kod kliničkog presađivanja organa koriste se sami ili češće u kombinaciji s plazmaferezom, a ponekad se uz njih primjenjuje rituksimab. Time se u senzibiliziranih bolesnika koji čekaju na presađivanje bubrega od umrle osobe smanjuje visoki titar ranije stvorenih anti-HLA protutijela. Također se omogućava presađivanje bubrega od živog darivatelja kada je križna proba pozitivna ili kada postoji ABO inkompatibilnost. IVIG mogu suzbiti akutno humoralno odbacivanje, a koriste se i za liječenje određenih virusnih infekcija nakon presađivanja organa.

IVIG imaju imunomodulacijsko djelovanje, inhibiraju anti-HLA protutijela te uzrokuju dugotrajnu supresiju i odstranjenje anti-HLA reaktivnih limfocita T i B. IVIG također inhibiraju citokinski prijenos signala i aloimunizaciju blokadom T staničnog receptora. Primjenjuju se nakon plazmafereze u sporoj intravenskoj infuziji. Tijekom davanja mogu se javiti blaže neželjene reakcije u vidu crvenila, tresavice,

glavobolje, mučnine, mijalgije i artralgije. IVIG također mogu uzrokovati prolazni aseptički meningitis te prolazno akutno bubrežno zatajenje zbog osmotskog oštećenja proksimalnih tubula ugljikovodičnim aditivima (55,56,86-90).

1.4.1.7. Monoklonska antilimfocitna protutijela

Monoklonsko protutijelo muromonab-CD3 (OKT3, Orthoclone T3) koristi se od 1987. g., a tijekom 90-ih godina počela su se koristiti humanizirana anti-CD25 (raniji naziv anti-Tac, prema engl. T-activation antigen) monoklonska protutijela daklizumab i baziliksimab. Noviji lijekovi su anti-CD20 protutijelo rituksimab protiv limfocita B i humanizirano anti-CD52 monoklonsko protutijelo alemtuzumab.

1.4.1.7.1. OKT3

OKT3 je mišji imuni globulin (IgG), deplecijsko i modulirajuće protutijelo na CD3 kompleks limfocita T. Dobiva se hibridizacijom mišjih limfocita B koji proizvode protutijela s mijelomskom staničnom linijom, koja omogućava stalno lučenje protutijela. Vezivanje OKT3 za T stanični CD3 receptor dovodi do endocitoze T staničnog receptora. Limfociti T bivaju opsonizirani i odstranjuju se iz cirkulacije u retikuloendotelni sustav. OKT3 također blokira funkciju citotoksičnih limfocita T. Osim deplecije $CD3^+$ limfocita T, dolazi i do deplecije limfocita T koji nose druge površinske biljege (CD4, CD8, CD11). Ovi se limfociti kroz nekoliko dana ponovno javljaju u cirkulaciji, međutim bez biljega CD3 pa su zbog toga neučinkoviti. Nazivaju se još moduliranim limfocitima T. Nakon prestanka djelovanja lijeka ponovno se javljaju i limfociti T s CD3 biljegom.

OKT3 se daje intravenski, najčešće tijekom 10 dana. Unutar 24-48 sati prati se smanjenje udjela $CD3^+$ stanica s normalne zastupljenosti od oko 60% na manje od

5%. Tijekom prvih dana primjene lijeka mogu nastupiti ozbiljne neželjene reakcije, koje su posljedica oslobađanja citokina i aktivacije komplementa. Potrebna je priprema bolesnika i premedikacija parenteralnim kortikosteroidom, antihistaminikom i antipiretikom. Vrućica i tresavica mogu biti posljedica primjene OKT3, ali je potrebno isključiti infekciju. Nagli nekardiogeni plućni edem može se javiti nakon prve ili druge doze lijeka, čak i u euvolemičnih bolesnika. Hemodinamske abnormalnosti zbog sindroma oslobađanja citokina smatraju se odgovornim za prolazno pogoršanje funkcije presatka. Nakon prekida primjene OKT3 i oporavka $CD3^+$ limfocita, može se ponovno javiti odbacivanje presatka koje se obično suzbija niskim pulsnim dozama prednizona. Infekcije su najčešće uzrokovane citomegalovirusom te se uglavnom primjenjuje profilaksa. Druge neželjene pojave obuhvaćaju razne neurološke komplikacije te hematološke komplikacije u vidu pojave limfoma, koagulopatije s trombozom presatka, trombotičke mikroangiopatije i trombocitopenije. U današnje vrijeme obavljaju se ispitivanja s humaniziranim OKT3 protutijelima, koja ne uzrokuju oslobađanje citokina (86-90,92).

1.4.1.7.2. Humanizirana anti-CD25 monoklonska protutijela

Humanizirana anti-CD25 monoklonska protutijela daklizumab i baziliksimab vežu se za α lanac (CD25, Tac) IL-2R. Ovaj receptor se pojačano izražava na aktiviranim limfocitima T. Vezivanje daklizumaba ili baziliksimaba zaustavlja odgovor posredovan IL-2, što pojačava učinak inhibitora kalcineurina koji smanjuju proizvodnju IL-2.

Baziliksimab i daklizumab u kombinaciji s inhibitorima kalcineurina i kortikosteroidima smanjuju učestalost kriza odbacivanja presatka. Oba lijeka su izvorno mišja monoklonska protutijela, koja su tako genetski modificirana da je veći

dio molekule nadomješten ljudskim IgG. Time je smanjena njihova imunogenost i produžen poluživot lijeka u perifernoj krvi, a ne javlja se reakcija na prvu dozu lijeka. Baziliksimab predstavlja kimer koji je 75% ljudskog i 25% mišjeg, a daklizumab je 90% ljudskog i 10% mišjeg podrijetla. Ovi lijekovi ne izazivaju značajne neželjene pojave. Opisana je rijetka pojava anafilaksije ili reakcije na prvu dozu baziliksimaba (86-90).

Baziliksimab i daklizumab blokiraju prijenos signala preko IL-2R, a time i Jak/Stat (engl. Janus kinases/signal transducers and activators of transcription) put prijenosa u stanicama, čime se onemogućuje stanična dioba (93,94). Opisano je da neposredno nakon primjene daklizumaba zastupljenost $CD3^{+}CD25^{+}$ limfocita pada s 15-30% na manje od 3% (95,96). Značajno jači učinak postiže se kod primjene baziliksimaba (tijekom 6-8 tjedana), jer on ima veći afinitet za IL-2R (97). Mehanizam djelovanja anti-CD25 blokade nije vezan samo na inhibiciju proliferacije, nego i ometanje IL-15 i IL-7 aktivacijskog puta, budući da navedeni lijekovi nishodno reguliraju zajednički IL2/IL15 beta lanac receptora (98). Jedan od mehanizama imunosupresivnog djelovanja je i izravna inhibicija izražaja CD156 (CD40L) molekule na membrani pomoćničkih limfocita T (99). Kod primjene ovih lijekova ne mijenja se značajno zastupljenost pojedinih vrsta limfocita T, limfocita B ili stanica prirodnih ubojica (NK) (100).

Poluživot baziliksimaba i daklizumaba traje duže od tjedan dana. Baziliksimab u dozi od 20 mg intravenski prije operacije i četvrtog dana po operaciji zasićuje IL-2R tijekom 30-45 dana. Kod daklizumaba preporuča se primjena u pet doza od 1 mg/kg tjelesne težine, prva prije operativnog zahvata, a iduće doze u intervalima od dva tjedna. Međutim, zadovoljavajući imunosupresivni učinak može se postići i s dvije

doze daklizumaba od 1-2 mg/kg tjelesne težine, a razina od 1 μg/ml seruma je dovoljna za saturaciju IL-2R (86,87,101-103).

1.4.2. Imunosupresivni protokol

Razvoj imunosupresivnih lijekova i novija saznanja o njihovom korištenju dovode do stalnog poboljšanja ishoda liječenja u bolesnika s bubrežnim presatkom. Nakon prvih iskustava stečenih u suzbijanju transplantacijske reakcije ozračivanjem cijelog tijela i primjenom lijekova, pokazalo se da je kombinacija kortikosteroida i azatioprina učinkovitija i manje štetna. Kod akutnih reakcija odbacivanja dokazan je povoljni učinak visokih doza kortikosteroida, a od 1966.g. se u transplantacijskoj medicini koriste i antilimfocitni globulini. Uz ove imunosupresivne lijekove preživljavalo je do 65% bubrežnih presadaka godinu dana.

Uvođenje ciklosporina 1983.g. dovelo je do značajnog poboljšanja preživljavanja presatka, i ciklosporin je u kombinaciji s kortikosteroidima i azatioprinom ubrzo postao temeljem standardnog imunosupresivnog protokola (27,28). Tijekom 1980-ih uvedeno je indukcijsko liječenje monoklonskim protutijelom OKT3, koje poput ALG uzrokuje depleciju limfocita. Razvoj novijih imunosupresivnih lijekova tijekom 1990-ih godina omogućio je daljnje poboljšanje rezultata liječenja presađivanjem bubrega. Pokazalo se da mikofenolat mofetil (ili mikofenolna kiselina) i takrolimus smanjuju učestalost i jačinu akutnih kriza odbacivanja u prvoj godini nakon presađivanja bubrega (86,87,104-109). Navodi se i da mikofenolat mofetil dodatno smanjuje kasni gubitak bubrežnog presatka neovisno o učestalosti akutnog odbacivanja (110). Humanizirana anti-CD25 monoklonska protutijela daklizumab i baziliksimab u indukcijskom liječenju, uz inhibitore kalcineurina i kortikosteroide, također smanjuju učestalost kriza odbacivanja. Za

razliku od inhibitora kalcineurina, „TOR“ inhibitori sirolimus i everolimus mogu usporiti pogoršanje umjereno oštećene funkcije bubrežnog presatka (86,87). Novi imunosupresivni lijekovi i protokoli također omogućavaju ukidanje ranije apsolutnih imunosnih barijera, tj. presađivanje organa mimo AB0 i jakih HLA barijera. Temelj protokola za desenzibilizaciju, sprječavanje i liječenje reakcije odbacivanja su IVIG. Pri tome značajnu ulogu ima kombinacija s plazmaferezom, splenektomijom ili rituksimabom, ali su neophodna dodatna ispitivanja (55).

Konvencionalni imunosupresivni protokol, koji se danas koristi u većini bolesnika, obuhvaća inhibitor kalcineurina (ciklosporin ili takrolimus), mikofenolat mofetil (ili mikofenolnu kiselinu) i kortikosteroid. Umjesto mikofenolat mofetila koristi se i sirolimus. Ako se uz ovu trojnu imunosupresivnu terapiju primijeni i indukcijsko liječenje poliklonskim ili monoklonskim protutijelima, dodatno se smanjuje učestalost akutnih reakcija odbacivanja (86,87,111). Uz navedene lijekove jednogodišnje preživljavanje bubrežnih presadaka iznosi više od 90%, a učestalost akutnih reakcija odbacivanja do 15% (86,87,112-114).

Kombinacija imunosupresiva primjenjuje se iz razloga što pojedini lijekovi imaju različito mjesto djelovanja u imunosnom odgovoru. K tome, neki lijekovi pokazuju aditivni ili sinergijski učinak, što omogućuje smanjenje doze, a time i štetnog djelovanja. Kod presađivanja bubrega se za vrijeme operativnog zahvata primjenjuje pulsna doza metilprednizolona intravenski, većinom 500 mg. Potom se prednizolon nastavlja u dozi od 0,3-0,4 mg/kg tjelesne težine dnevno ili se, prvenstveno u bolesnika s povećanim rizikom za odbacivanje, doza postupno smanjuje. Tijekom idućih nekoliko mjeseci doza se smanjuje do doze održavanja od 0,1 mg/kg dnevno. U bolesnika s niskim rizikom za odbacivanje presatka može se pokušati i ukidanje kortikosteroida. Inhibitori kalcineurina većinom se uvode

postupno do postizavanja željene razine lijeka u krvi, kod ciklosporina 200-250 ng/ml, kod takrolimusa 10-12 ng/ml. Perioperativna primjena inhibitora kalcineurina povećava učestalost i trajanje odgođenog preuzimanja funkcije ili primarne afunkcije presatka, osobito kod visokih doza lijekova i duge hladne ishemije presatka (više od 24 sata). Odgođeno preuzimanje funkcije manifestira se niskom satnom diurezom (ispod 50 ml) i održavanjem visoke koncentracije kreatinina u serumu (iznad 300-400 μg/l). Antimetabolit mikofenolat mofetil daje se u ranom razdoblju nakon presađivanja većinom u dnevnoj dozi od 2 g, odnosno mikofenolna kiselina u dnevnoj dozi od 1,44 g.

U ranom razdoblju nakon presađivanja je za suzbijanje reakcije odbacivanja potrebna jača imunosupresija. Stoga se koriste veće doze imunosupresivnih lijekova, koji se primjenjuju i u liječenju održavanja, ili se dodaju indukcijski agensi - poliklonska ili monoklonska protutijela prije ili tijekom operativnog zahvata. Indukcijsko imunosupresivno liječenje potrebno je osobito u bolesnika s visokim rizikom za odbacivanje ili za odgođeno preuzimanje funkcije presatka. Doziranje i trajanje liječenja monoklonskim ili poliklonskim protutijelima ovisi o vrsti pripravka, o kombinaciji s drugim imunosupresivnim liječenjem te procijenjenom imunosnom riziku za odbacivanje organa. Za razliku od anti-CD25 monoklonskih protutijela, primjena deplecijskih antilimfocitnih protutijela (antilimfocitni globulini ili OKT3) omogućava odgođeno uvođenje inhibitora kalcineurina (sekvencijalna kvadripl terapija).

U imunosupresivnom liječenju održavanja većinom se koristi kombinacija od dva ili tri imunosupresivna lijeka, najčešće inhibitor kalcineurina, mikofenolat mofetil (ili mikofenolna kiselina) i/ili kortikosteroid. Inhibitori kalcineurina imaju štetno djelovanje na srčanožilni sustav i pogoduju razvoju kronične nefropatije presatka, a

takrolimus češće uzrokuje i dijabetes (86,87,104,105,115, 116). Ispitivanja pokazuju da se najbolje dugoročno preživljavanje presatka kod primjene ciklosporina postiže primjenom dnevne doze od 3-6 mg/kg tjelesne težine (118). Opisano je da daljnje smanjenje doze ili ukidanje ciklosporina pogoršava preživljavanje bubrežnog presatka (115,116,119,120). Kortikosteroidi također brojnim neželjenim djelovanjima povećavaju morbiditet i mortalitet bolesnika s bubrežnim presatkom (86,87). Kako bi se smanjila učestalost i jačina neželjenih djelovanja, ispituju se protokoli s novijim lijekovima te manjom dozom kortikosteroida ili inhibitora kalcineurina, njihovim ranijim ukidanjem ili potpunim izostavljanjem. Međutim, uvođenje novih imunosupresivnih lijekova i protokola otežava potreba za dugotrajnim praćenjem i liječenjem velikog broja ispitanika u kontroliranim kliničkim studijama, budući da je primjena modernih lijekova omogućila dugogodišnje preživljavanje presatka i bolesnika.

Uz imunosupresivno liječenje obvezatno se primjenjuju lijekovi za zaštitu želučane sluznice, profilaksu infekcije i tromboze te smanjenje komplikacija srčanožilnih bolesti i drugih rizika. Prokoagulantno djelovanje imunosupresivnih lijekova u ranom poslijeoperacijskom tijeku u 2-7% bolesnika dovodi do tromboze krvnih žila presatka. Pored rane mobilizacije bolesnika i bandaže nogu, potrebno je primijeniti niskomolekularni heparin. Antagonisti kalcija, osobito verapamil i diltiazem, smanjuju vazokonstrikciju uzrokovanu inhibitorima kalcineurina, čime zaštićuju presadak od ishemičnog oštećenja i nefrotoksičnog djelovanja. Zbog kompeticije s enzimskim sustavom P450, ovi lijekovi povećavaju razinu inhibitora kalcineurina u krvi, što omogućuje smanjenje njihove doze. Imunosupresivni lijekovi mogu dovesti do razvoja hiperlipidemije, šećerne bolesti, arterijske hipertenzije,

koštane bolesti, infektivnih komplikacija te nastanka malignoma i drugih stanja, koja se moraju primjereno liječiti (86, 121,122).

Liječenje treba prilagoditi potrebama bolesnika tako da postoji ravnoteža između učinkovitosti i podnošljivosti primijenjenih lijekova. U starijih primatelja bubrežnog presatka vodeći uzroci smrti su infekcije i srčanožilne bolesti, pa je potrebno smanjiti jačinu imunosupresije. Stariji primatelji i bolesnici s poremećajem funkcije jetre, koja je najčešće posljedica toksičnog učinka lijekova ili preboljelog hepatitisa, razvijaju slabiji imunosni odgovor, reakcije odbacivanja su rjeđe i slabijeg intenziteta, a bolesnici su skloniji infekcijama. Kod presađivanja bubrega od živog darivatelja, osobito uz dobru HLA podudardnost, također se smanjuje intenzitet imunosupresije. Jaču imunosupresiju zahtijevaju bolesnici s povećanim imunosnim rizikom, npr. kod slabe HLA podudarnosti, senzibilizacije na tkivne antigene, ranijeg presađivanja organa, kombiniranog presađivanja bubrega i gušterače, odgođenog preuzimanja funkcije presatka, mlađi bolesnici ili pripadnici crne rase.

Nekoliko mjeseci ili godina nakon presađivanja dolazi do prilagodbe između primatelja i presatka te je potrebno smanjiti dozu imunosupresivnih lijekova, međutim, lijekove i dalje treba uzimati svakodnevno i trajno. Zbog nesuradnje, nepravilnog uzimanja ili svojevoljnog ukidanja imunosupresivnih lijekova, u oko četvrtine bolesnika dolazi do pogoršanja ili gubitka funkcije presatka (42,86,87,123,124).

1.4.3. Reakcija odbacivanja presatka i njezino liječenje

Reakcija odbacivanja može se klasificirati kao hiperakutna, akcelerirana akutna, akutna i kronična. Hiperakutna reakcija odbacivanja nastaje ubrzo nakon postavljanja vaskularnih anastomoza. Ona dovodi do opsežne vaskularne tromboze, a

presadak postaje mlohav ili cijanotičan i tvrd, te može rupturirati. Posredovana je citotoksičnim protutijelima IgG protiv HLA molekula razreda I, kao posljedica ranije senzibilizacije. Akcelerirana akutna reakcija odbacivanja javlja se u prvom tjednu, a nakon prvih 24 sata od presađivanja. Ona je najvjerojatnije posljedica odgođenog imunosnog odgovora na raniju senzibilizaciju na HLA antigene, a osim reakcije posredovane protutijelima, sudjeluju i stanični mehanizmi. Hiperakutna i akcelerirana akutna reakcija odbacivanja danas su, zbog rutinskog izvođenja križne probe prije presađivanja te poštivanja AB0 podudarnosti, postale rijetkost. Akutna reakcija odbacivanja može biti posredovana stanicama i/ili protutijelima. Stanicama posredovana reakcija javlja se najčešće u prva tri mjeseca, a nakon prvog tjedna od presađivanja, za razliku od protutijelima posredovane reakcije odbacivanja, koja se javlja većinom u prva tri tjedna nakon presađivanja, i to osobito u bolesnika senzibiliziranih na HLA antigene. Umjesto kronične reakcije odbacivanja, danas se više govori o kroničnoj nefropatiji presatka, budući da pored imunosnih uključuje i neimunosne čimbenike koji uzrokuju oštećenje presatka (84,125,126).

Akutna reakcija odbacivanja bubrežnog presatka definira se kao akutno pogoršanje njegove funkcije uz specifične strukturne promjene. Osnovna klinička varijabla, porast koncentracije serumskog kreatinina, relativno je kasni i nespecifični pokazatelj, koji ukazuje na već značajno uznapredovalu reakciju odbacivanja i patohistološko oštećenje. Na akutno odbacivanje treba posumnjati u bolesnika s uspostavljenom funkcijom presatka, kada zastane pad koncentracije kreatinina u serumu ili ona naglo poraste. Klinički se može utvrditi smanjenje diureze, porast krvnog tlaka, povećanje i moguća bolna osjetljivost presatka te vrućica. Kliničkim i laboratorijskim nalazima te slikovnim metodama prikaza presatka potrebno je isključiti druge moguće uzroke poremećaja funkcije presatka. Dijagnozu akutnog

odbacivanja treba patohistološki potvrditi, a analiza bioptata je značajna za odabir intenziteta i za prognozu uspjeha liječenja reakcije odbacivanja (125-128).

Uz današnje imunosupresivno liječenje, akutna reakcija odbacivanja javlja se u do 15% bolesnika. Ovisno o tome da li se radi o odbacivanju posredovanom stanicama i/ili protutijelima, u liječenju se koriste pulsne doze kortikosteroida, monoklonska ili poliklonska protutijela, promjena imunosupresivnog liječenja održavanja (doze ili vrste lijeka) te druge metode liječenja. Kod prve akutne reakcije odbacivanja staničnog tipa preporučene su visoke doze metilprednizolona intravenski. Poliklonska ili monoklonska protutijela (ALG i OKT3) su učinkovitija u suzbijanju prve reakcije odbacivanja presatka, međutim njihova neželjena djelovanja i visoka cijena razlogom su da se daje prednost primjeni kortikosteroida kao prvom izboru liječenja (128-131). Monoklonska i poliklonska protutijela preporučuju se za liječenje osobito teških (Banff IIB ili III) ili humoralnih reakcija odbacivanja, reakcija koje se ponavljaju ili su rezistentne na kortikosteroide, a primjenjuju se i u bolesnika s kontraindikacijama za kortikosteroide. Reakcija odbacivanja smatra se rezistentnom na kortikosteroide kada trećeg dana primjene pulsnih doza i dalje raste koncentracija serumskog kreatinina, sve do uvođenja drugog lijeka protiv odbacivanja. Kada se nakon provedenog liječenja ALG ponovi odbacivanje, preporuča se modifikacija održavajućeg imunosupresivnog liječenja, npr. povećanjem doze inhibitora kalcineurina ili zamjenom ciklosporina s takrolimusom, dodavanjem mikofenolat mofetila ili sirolimusa. ALG zbog profila neželjenih djelovanja imaju prednost pred OKT3 (učinak prve doze), a pripravci ALG dobiveni od kunića učinkovitiji su od konjskih (86, 125-128).

Metilprednizolon se primjenjuje intravenski u pulsnoj dozi od 3-5 mg/kg (do najviše 1 g uz brzo smanjivanje doze) tijekom tri do pet dana, uz modifikaciju

imunosupresivnog liječenja održavanja. Potom se doza kortikosteroida brzo smanjuje do doze održavanja. U 65-75 % bolesnika uspijeva se suzbiti prva epizode akutnog odbacivanja, što se očituje povećanjem diureze i snižavanjem koncentracije serumskog kreatinina. Standardno se provodi i profilaksa ulkusne bolesti, infekcije i tromboze. Ako nakon trećeg dana liječenja ne dolazi do suzbijanja reakcije odbacivanja, preporuča se primjena ALG ili OKT3. Preporučena doza konjskog ALG je 10-15 mg/kg, kunićjeg ALG 2 mg/kg tjelesne težine, a OKT3 5 mg/kg tijekom 10-14 dana. U oko 50% bolesnika nakon liječenja s OKT3 ponovno dolazi do reakcije odbacivanja, koja se u približno 75% slučajeva može suzbiti pulsnim dozama kortikosteroida. Kod titra anti-mišjih protutijela (HAMA, prema engl. human anti-mouse antibodies) većeg od 1:100 ili ponovljene reakcije odbacivanja, koja se javlja nakon trećeg mjeseca od presađivanja bubrega, primjena OKT3 u manje od 25% bolesnika može suzbiti reakciju odbacivanja (86,125-128).

Za liječenje kasnih reakcija odbacivanja koje se javljaju nakon trećeg mjeseca od presađivanja bubrega, preporučuju se pulsne doze kortikosteroida. U osnovi se većinom radi o kroničnom odbacivanju, i često je potrebno prihvatiti pogoršanje funkcije ili gubitak presatka. Nepotrebnim intenziviranjem imunosupresije može se izazvati dodatne komplikacije i pogoršati stanje bolesnika i (125-128).

Humoralno odbacivanje označava karakteristični patohistološki nalaz uz prisustvo C4d komponente komplementa, $CD20^{+}$ stanica i nalaz donor specifičnih protutijela u serumu primatelja. U liječenju humoralnog odbacivanja primjenjuje se plazmafereza s ili bez IVIG, imunoadsorpcija, rituksimab ili alemtuzumab. Većinom se koriste visoke doze IVIG (2 g/kg tjelesne težine) ili niske doze CMVIG u kombinaciji s plazmaferezom do zadovoljavajućeg smanjenja antidonorskih protutijela. U bolesnika s visokim titrom antidonorskih protutijela, reakciju

odbacivanja može suzbiti rituksimab ili hitna splenektomija. Međutim, humoralno odbacivanje može se ponavljati, a mogu ga pratiti ili uslijediti epizode staničnog odbacivanja (125-128).

1.4.4. Razvoj novih lijekova i metoda liječenja kod presađivanja bubrega

Vrlo često razvoj novih imunosupresivnih lijekova prestaje već na razini pretkliničkih ispitivanja, a velika većina onih koji uđu u kliničko ispitivanje ne prolazi njegovu treću fazu. Drugi način kliničkog razvoja ovih lijekova, prije ispitivanja kod presađivanja organa, jest provjera njihove učinkovitosti u autoimunosnim bolestima, kao što su psorijaza ili artritis. Modifikacijom provjerenih imunosupresivnih lijekova, dobiveni su lijekovi s boljim karakteristikama. Primjerice, everolimus (Certican, SDZ RAD) je strukturni analog sirolimusa s boljom raspoloživošću kod primjene na usta, myfortic (ERL080A) su obložene želučanootporne tablete mikofenolne kiseline sa sporim otpuštanjem, a takrolimus MR je dugodjelujući oblik takrolimusa koji se uzima samo jednom dnevno. Pretklinička ispitivanja s ISA247 (R 1524), izomernom mješavinom analoga ciklosporina A, pokazala su da ova tvar može imati jače imunosupresivno djelovanje od dosadašnjih inhibitora kalcineurina, a uz značajno slabiji nefrotoksični učinak (132).

Među tvari koje su u posljednje vrijeme bile u fokusu pretkliničkih i kliničkih ispitivanja, a koje su kod liječenja presađivanjem bubrega pokazale nedovoljnu učinkovitost i/ ili ozbiljna toksična djelovanja, ubrajamo:

- Fingolimod (FTY720), analog sfingozina (antagonist sfingozin-1-fosfatnog receptora), koji sprječava izlazak limfocita iz timusa u krv i iz sekundarnih limfatičkih organa u eferentne limfne žile. Međutim, zbog mogućeg razvoja bradikardije i makularnog edema s gubitkom vida, obustavljena su daljnja ispitivanja (133).

- FK778, analog aktivnog metabolita leflunomida (Arava), od kojeg ima kraći poluživot. Leflunomid se koristi u liječenju reumatoidnog artritisa. Njegov aktivni metabolit malononitrilamid blokira dihidro-orotat dehidrogenazu, koja je neophodna za *de novo* sintezu pirimidina u limfocitima. Malononitrilamid blokira i aktivnost tirozin kinaze. Leflunomid je u pokusima pokazao djelotvornost u sprječavanju i liječenju akutne te u suzbijanju kronične reakcije odbacivanja presatka. Uz to ima i antivirusno djelovanje protiv CMV, herpes i polioma virusa (134,135). Kod primjene FK778 opisan je povoljan učinak u bolesnika s kroničnom nefropatijom presatka, budući da sprječava stvaranje neointime, te u BK virusnoj nefropatiji. Međutim, FK778 može uzrokovati ozbiljne neželjene reakcije, a u sprječavanju odbacivanja presatka nije se pokazao učinkovitijim od konvencionalnog imunosupresivnog liječenja (136).

- Anti-IL-15 protutijela, koja suzbijaju djelovanje ovog citokina. IL-15 je faktor rasta koji regulira različite funkcije brojnih imunosnih stanica, a pojačano se izražava u presatku tijekom akutne i kronične reakcije odbacivanja. Ipak, pretklinička ispitivanja s anti-IL-15 protutijelima nisu polučila očekivani uspjeh (137, 138).

- CTLA-4-Ig (citotoksični T-limfocitni antigen 4-imunoglobulin, prema engl. cytotoxic lymphocyte antigen 4) je homolog CD28 molekule. Ovaj pripravak ometa kostimulaciju limfocita T koja normalno uslijedi nakon jakog vezivanja CD28 za CD80/86 (B7) molekulu. Nedostatak kostimulacije dovodi do anergije i apoptoze limfocita T. Abatacept je CTLA-4-Ig prve generacije, a koristi se u liječenju reumatoidnog artritisa. Suprotno očekivanjima, ometanje kostimulacije limfocita s CTLA-4-Ig prve generacije, kao i monoklonskim protutijelima protiv CD28 i CD40 molekule, nije se pokazalo dovoljno učinkovitim (139).

- Anti-CD154 monoklonsko protutijelo također ometa kostimulaciju, i to putem CD154/CD40. Ispitivanja tog pripravka, kao i anti-CD40 blokirajućih protutijela, obustavljena su zbog trombotičkih komplikacija (139,140).

- Efalizumab (anti-CD11a, anti-LFA1), humanizirano anti-LFA-1 monoklonsko protutijelo, koje sprječava međudjelovanje LFA-1 s ICAM molekulama, čime blokira T staničnu adheziju i aktivaciju. Time ometa stvaranje efektorskih stanica, ali ne dovodi do deplecije limfocita. Ispitivanja su obustavljena zbog slučajeva progresivne multifokalne encefalopatije (141).

- Druga protutijela na adhezijske molekule, odulimomab (anti-LFA-1 protutijelo) i enlimomab (protutijelo na ICAM-1). U ispitivanjuma nisu pokazala značajno smanjenje učestalosti akutnih reakcija odbacivanja, niti odgođene funkcije presatka (139).

- BCX-4208 (R3421), inhibitor purinske nukleozid fosforilaze koja je neophodna za proliferaciju aktiviranih limfocita T. Ovaj pripravak također nije pokazao zadovoljavajuće djelovanje u liječenju odbacivanja presatka (139).

U tijeku su klinička ispitivanja s inhibitorima enzima JAK3 (citoplazmatska tirozin kinaza) i PKC. Ovom inhibicijom ometa se prijenos signala nishodno od receptora sa stanične površine limfocita, što značajno smanjuje antigenom induciranu aktivaciju limfocita T. Četiri JAK i tri izoforme PKC značajne su za prijenos signala u limfocitima T i B.

- JAK3 inhibitor CP690,550 selektivno inhibira ovaj enzim, koji je izražen u imunosnim stanicama, a veže se samo za citokinske receptore koji sadrže γ-lanac i koji sudjeluju u JAK/STAT putu prijenosa signala (142-144).

- Inhibitor PKC sotrastaurin (AEB071) inhibira osobito θ izoformu PKC, a uz to značajno ometa adheziju limfocita T posredovanu LFA-1. Sotrastaurin blokira

aktivaciju limfocita T neovisno o kalcineurinu, zbog čega ne izaziva nuspojave koje su karakteristične za inhibitore kalcineurina. U tijeku su ispitivanja sa sotrastaurinom u zamjenu za ili bez primjene inhibitora kalcineurina (139,145).

Novi biološki lijekovi koji se ispituju za indukciju imunosupresije kod presađivanja organa razlikuju se od lijekova koji su se do sada koristili:

- Belatacept (LEA29Y, BMS-224818) je CTLA-4-Ig druge generacije. On se sastoji od izvanstanične domene CTLA4 molekule vezane s Fc dijelom IgG1. Belatacept se veže s puno većim afinitetom za oba CD28 liganda, CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2), zbog čega je učinkovitiji od CTLA-4-Ig prve generacije u sprječavanju potpune aktivacije limfocita (kostimulacije), što dovodi do njihove apoptoze. U tijeku je treća faza kliničkih ispitivanja. Prvi rezultati ukazuju na to da belatacept u kombinaciji s mikofenolat mofetilom, baziliksimabom i kortikosteroidima omogućava imunosupresivno liječenje bez inhibitora kalcineurina, čime se postiže bolja bubrežna funkcija i smanjenje metaboličkih poremećaja (146-148).

- Alefacept (anti-CD2) je fuzijska receptorska bjelančevina koja se sastoji od izvanstanične domene LFA-3, vezane za Fc dio humanog IgG1. LFA-3 dio se veže za CD2 na limfocitima T, čime blokira vezivanje CD2 za ligand LFA-3 na antigen predočnoj stanici, što inhibira ovaj put koaktivacije. Alefacept je učinkovitiji u inhibiciji memorijskih limfocita T, a dovodi i do njihove deplecije. Ovaj pripravak se koristi za liječenje psorijaze, a u tijeku je druga faza kliničkog ispitivanja u bolesnika s presađenim bubregom, u kojem se alefacept daje u kombinaciji s takrolimusom, mikofenolat mofetilom i kortikosteroidima (139,149).

Biološki lijekovi, koji su već odobreni za liječenje hematoloških bolesnika, a ispituju se kod presađivanja organa, su alemtuzumab i rituksimab:

- Alemtuzumab (Campath-1H), humanizirano anti-CD52 monoklonsko protutijelo protiv limfocita B i T, odobreno za liječenje kronične limfocitne leukemije. Ovaj lijek uzrokuje brzu i dugotrajnu limfopeniju koja traje mjesecima. Kod presađivanja organa koristi se za indukciju imunosupresije i kod akutnih reakcija odbacivanja, međutim kontrolirane studije nisu provedene. Njegova učinkovitost se ispituje posebno kod reakcija odbacivanja presatka rezistentnih na kortikosteroide s dokazanom infiltracijom $CD20^+$ limfocita B, zatim kod reakcija staničnog odbacivanja patohistološkog stupnja Banff IB ili većeg, te kao dodatak u liječenju humoralnog odbacivanja. Komplikacije liječenja alemtuzumabom su infekcije i poslijetransplantacijska limfoproliferativna bolest. Lijek se primjenjuje u jednoj ili u dvije doze uz profilaksu infekcija i smanjenje ostalog imunosupresivnog liječenja. U ispitivanjima se nastavlja monoterapija sirolimusom ili liječenje niskom dozom inhibitora kalcineurina uz brzo ukidanje kortikosteroida, ili bez njihove primjene (139,150,151).

- Rituksimab (Rituxan), anti-CD20 monoklonsko protutijelo, odobreno za liječenje određenih oblika non-Hodgkin limfoma. Ovaj lijek dovodi do brze i dugotrajne deplecije limfocita B u cirkulaciji i tkivima, koja traje mjesecima. Kod liječenja presađivanjem organa koristi se za smanjenje visokog titra anti-HLA protutijela, za presađivanje organa od živog darivatelja u slučaju pozitivne križne reakcije ili AB0 nepodudarnosti, za suzbijanje akutne humoralne reakcije odbacivanja te za liječenje poslijetransplantacijske limfoproliferativne bolesti, koju karakteriziraju $CD20^+$ stanice. Standardno se primjenjuje u četiri doze, koje se daju jednom tjedno, uz premedikaciju antipiretikom i antihistaminikom (139,152).

Druga protutijela sa značajnim imunosupresivnim svojstvima koja se trenutno ispituju:

- Infliksimab (Remicade), kimerno monoklonsko protutijelo koje se veže za receptore TNF-α, čime sprječava njegovo djelovanje. Lijek je odobren za liječenje Crohnove bolesti i reumatoidnog artritisa (153).

- Humanizirana anti-CD3 protutijela, npr. HuM291, 4OKT_3-gama-1 (ala-ala), zadržavaju značajna imunosupresivna svojstva, ali izazivaju manje nuspojava, jer ne aktiviraju ljudske limfocite T i ne induciraju oslobađanje citokina (154).

- T10B9.1A, mišje monoklonsko protutijelo protiv jednog epitopa α/ß heterodimera T staničnog receptora. Po učinkovitosti je sličan OKT3, ali ne dovodi do oslobađanja citokina te su neželjene reakcije blaže. Međutim, u bolesnika dolazi do stvaranja anti-mišjih protutijela (HAMA, prema engl. human anti-mouse antibodies) (155).

Pored pripravaka koji pretežito potiskuju T stanični odgovor, razvijaju se učinkoviti lijekovi i metode za suzbijanje B staničnog odgovora i stvaranja anti-HLA protutijela. Dosadašnja ispitivanja plazmaferezom pokazala su varijabilni učinak kod liječenja akutnih epizoda humoralnog odbacivanja te bolju djelotvornost kada se plazmafereza kombinira s CMVIG. Ispitivanja su pokazala da se kombinacijom plazmafereze, IVIG i rituksimaba postiže zadovoljavajući učinak u suzbijanju humoralnog odgovora (139,152,156). Ovim načinom liječenja može se smanjiti senzibilizacija i neutralizirati pozitivna križna reakcija, tako da se većini bolesnika može omogućiti presađivanje bubrega. Među novim tvarima za desenzibilizaciju i liječenje humoralne reakcije odbacivanja ispituju se:

- Humanizirani lijekovi protiv limfocita B: anti-CD20 protutijela, koja uključuju ofatumumab, belimumab, atacicept, ocrelizumab, AME-133, te humanizirano anti-CD22 monoklonsko protutijelo epratuzumab (139).

- Eculizumab, humanizirano anti-C5a monoklonsko protutijelo. Vezivanjem za C5a fragment komplementa može spriječiti ozljedu uzrokovanu komplementom, koja nastaje u prisustvu donor-specifičnih protutijela (139).

- Bortezomib i carfilzomib su inhibitori proteasoma, velikih bjelančevinastih tvari koje su značajne za degradaciju nepotrebnih ili krivo savijenih bjelančevina. Bortezomib je odobren za liječenje multiplog mijeloma. On može suzbiti humoralnu reakciju odbacivanja i smanjiti titar donor-specifičnih protutijela, međutim jako je neurotoksičan. Carfilzomib pripada drugoj generaciji inhibitora proteasoma (139,157).

- APRIL (TNFSF13, CD256, TALL2), mišje protutijelo protiv ljudskog TNF (158).

Ispitivanja također pokazuju da lokalna koncentracija kemokina određuje udomljavanje leukocita u presadak, a kemokinski receptori CXCR3 povezuju se s razvojem akutnog odbacivanja. U bolesnika s delecijom gena za kemokinski receptor CCR5 zabilježeno je dugotrajnije preživljavanje presatka (159,160).

Fotofereza je oblik izvantjelesne fotokemoterapije, koja se koristi za liječenje kožnih T-staničnih limfoma i brojnih autoimunih bolesti. Periferni limfociti, dobiveni aferezom, podvrgavaju se učinku 8-metoksipsoralena i ultraljubičastom svjetlu, čime se suzbijaju klonovi aktiviranih limfocita T. Fotoferezom može se smanjiti učestalost odbacivanja u bolesnika s presatkom srca i bubrega te suzbiti reakcije odbacivanja koje ne reagiraju na agresivno imunosupresivno liječenje (161).

Imunomodulacijom označava se mogućnost nespecifične promjene imunosnog sustava radi lakšeg prihvaćanja presatka, bez oštećenja stanica ili mehanizama izvršnog odgovora. Tolerancijom se označava odsustvo imunosnog odgovora na specifične antigene. Razlikujemo mehanizme centralne tolerancije u timusu i periferne tolerancije u limfnim tkivima izvan timusa, koji nastaju tijekom razvitka i sazrijevanja limfocita i koji sprječavaju imunosni odgovor na vlastite antigene. Periferna tolerancija pokušava se postići djelovanjem na više različitih mehanizama. Indukcijom programirane stanične smrti ili apoptoze pokušalo se odstraniti aktivirane limfocite T, blokadom kostimulacije limfocita T postići anergija, a djelovanjem na citokine suprimirati aktivaciju limfocita T. U novijim ispitivanjima koriste se i imunomodulacijski peptidi, koji su dobiveni od aminokiselinskih sljedova pronađenih u MHC molekulama. Limfociti T koji konstitucijski izražavaju CD25, α lanac IL-2R, zovu se regulacijske stanice ($Foxp3^+$ stanice) i smatraju se značajnim za potiskivanje imunosnog odgovora (69, 70,162-165).

Pored farmakoloških metoda imunosupresije, ispituju se i drugi protokoli za indukciju tolerancije. Pokazalo se da transfuzije krvi mogu imati povoljan učinak na preživljavanje presatka, ali mogu uzrokovati i senzibilizaciju na HLA antigene. Infuzija donor-specifične koštane srži u kombinaciji s kratkotrajnom nespecifičnom imunosupresijom omogućava dugotrajno preživljavanje presatka bez imunosupresivnog liječenja. Ispituje se i presađivanje vaskulariziranog tkiva timusa uz bubrežni presadak. Glavni čimbenik koji dozvoljava indukciju imunosne tolerancije prema organu darivatelja najvjerojatnije je uspostava i podržavanje miješanog hematopoetskog kimerizma (166-168)

Intenzivno se istražuju metode genetskog inženjeringa, metode inkapsulacije, liječenje matičnim stanicama i ksenotransplantacijom. Liječenje

ksenotransplantacijom polučilo je značajan uspjeh u vidu dugotrajnog preživljavanja ksenogeničnih presadaka Langerhansovih otočića (169-171).

Cilj transplantacijskih imunologa je specifična tolerancija prema tkivu i/ili organu darivatelja, a bez oštećenja imunosti na ostale nevlastite antigene. Ovaj cilj je za sada postignut u određenim eksperimentalnim uvjetima, međutim do sada nije razvijen niti jedan pouzdani klinički protokol.

1.5. Pokazatelji reakcije odbacivanja presatka

Akutna reakcija odbacivanja javlja se uz današnje imunosupresivno liječenje u manje od 15% bolesnika (172). Najčešće se razvija u ranom razdoblju nakon presađivanja i većinom ima asimptomatičan tijek. Radi ranog otkrivanja reakcije odbacivanja ili drugih komplikacija liječenja potrebno je temeljito praćenje bolesnika uz bilježenje kliničkih podataka značajnih za procjenu funkcije presatka. Na temelju kliničke slike, laboratorijskih i slikovnih metoda prikaza te analize bioptata presatka, može se utvrditi da li je u podlozi poremećene funkcije presatka reakcija odbacivanja¸ infekcija, toksičnost lijekova te kirurška i/ ili druga komplikacija.

1.5.1. Kliničko praćenje bolesnika i funkcije presatka

Za kliničko praćenje bolesnika od velikog značaja su anamneza, fizikalni nalaz, podaci o morbiditetu, ostatnoj diurezi te prijeoperacijskoj pripremi. Neophodno je poznavanje podataka o darivatelju, postupku eksplantacije i prezervacije organa, tijeku kirurškog zahvata implantacije organa, ev. nastupu komplikacija i njihovom zbrinjavanju. Izgled presatka, osobito nakon anastomoze krvnih žila i puštanja cirkulacije, te brzina uspostavljanja i obim diureze, mogu ukazivati na oštećenje organa. U ranom poslijeoperacijskom tijeku prate se vitalne funkcije bolesnika, kao što su srčana akcija, arterijski i centralni venski krvni tlak, satna i dnevna diureza, tjelesna težina, balans tekućine te laboratorijski parametri. Ovi pokazatelji, uz fizikalni nalaz, pomažu u određivanju primjerene hidracije bolesnika i mogu ukazivati na razvoj komplikacija, npr. kirurških ili srčanožilnih.

Kod nekompliciranog tijeka, neposredno po presađivanju bubrega javlja se obilna diureza (poliurija), koja se u idućim danima postupno smanjuje. Pri tome se u laboratorijskim nalazima prati brzo snižavanje koncentracije serumskog kreatinina.

Bolesnici s odgođenim preuzimanjem funkcije presatka, najčešće kao posljedica akutne tubularne nekroze, često su oligurični i mogu zatrebati liječenje dijalizom. Oligurijom se nakon presađivanja bubrega obično označava satna diureza ispod 50 ml, pri čemu treba voditi računa o ostatnoj diurezi vlastitih bubrega (125,126,173).

Na reakciju odbacivanja može upućivati povećanje i/ili bolnost presatka, vrućica, porast krvnog tlaka, porast tjelesne težine i smanjenje diureze. Potrebno je isključiti kirurške komplikacije, npr. hematom, opstrukciju mokraćnih puteva, propuštanje mokraće na ureterocistoneostomiji, nekrozu uretera ili trombozu krvnih žila. Kod kirurških komplikacija mogu se javiti bolovi iznad presatka te povećano izlučivanje sekreta preko postavljenih drenova. Propuštanje mokraće može se dokazati intravenoznom infuzijom indigo karmina, kojim se sekret oboji plavkasto. Reakcija odbacivanja može se zamijeniti s toksičnim djelovanjem inhibitora kalcineurina, budući da može dovesti do porasta tjelesne težine i pojave edema zbog smanjenja glomerularne filtracije i reapsorpcije natrija u tubulima, a oba stanja mogu se očitovati i neoligurićnim pogoršanjem funkcije presatka. Akutnu reakciju odbacivanja mogu pratiti i simptomi slični onima kod gripe ili infekcije gornjih dišnih puteva. Porast tjelesne temperature nespecifičan je znak, koji može biti posljedica reakcije odbacivanja, infekcije, atelektaze i/ ili reakcije na lijek. U ranom poslijeoperacijskom tijeku infekcije su najčešće uzrokovane bakterijama u poslijeoperacijskoj rani, mokraćnom ili dišnom sustavu, dok kasnije prevladavaju oportunističke infekcije. Kod pijelonefritisa može se, kao i kod reakcije odbacivanja, palpirati povećan i bolno osjetljiv presadak, a u laboratorijskim nalazima najčešće se uočava porast serumskog kreatinina. Na arterijsku stenozu može ukazivati auskultatorni nalaz sistoličkog šuma iznad presatka (125,126,173,174).

Kliničko praćenje bolesnika obuhvaća rutinske laboratorijske nalaze, koji uključuju kompletnu krvnu sliku, serumsku koncentraciju ureje i kreatinina, testove jetrene funkcije, elektrolite, glukozu, lipide, urate, C-reaktivni protein, nivo imunosupresivnih lijekova, kompletnu analizu mokraće, uključujući citološki pregled sedimenta i urinokulturu. U slučaju vrućice neophodna je bakteriološka analiza mokraće, krvi, izlučevina iz drenova, briseva grla i nosa. Potrebno je redovito određivanje biljega citomegalovirusne infekcije (npr. titar citomegalovirusnih protutijela IgG i IgM ELISA metodom, prikazivanje citomegalovirusne DNK PCR metodom), a u slučaju potrebe proširuju se dijagnostičke pretrage za dokazivanje infekcije. U utvrđivanju kirurških komplikacija može pomoći laboratorijska analiza izlučenih sekreta, primjerice povećana koncentracija kreatinina ukazuje na propuštanje mokraće na mjestu drenaže.

Značajan porast koncentracije kreatinina u serumu, npr. za više od 25% u odnosu na ranije postignute vrijednosti, gotovo je uvijek posljedica stanja koje ugrožava funkciju presatka. Potrebno je isključiti anatomske ili kirurške uzroke, pri čemu su od posebne važnosti slikovne metode prikazivanja presatka te patohistološka analiza bioptata presatka. Kada porast koncentracije kreatinina prati visoka razina inhibitora kalcineurina u krvi, empirijski se može smanjiti doza lijeka, međutim, ako se funkcija presatka ne oporavlja, potrebno je učiniti biopsiju. Reakcija odbacivanja može se javiti i kod visokih koncentracija inhibitora kalcineurina u krvi, iako nefrotoksično djelovanje može biti prisutno i kod niskih koncentracija lijekova u krvi. Funkcija bubrežnog presatka može se pratiti i određivanjem cistatina C ili računskim klirensom kreatinina, primjerice pomoću Cockcroft-Gaultove formule. Prilikom rutinske analize urina često se u ranom polijeoperacijskom tijeku uočava hematurija, ali ako ona perzistira, zahtijeva dodatnu urološku obradu. Pijurija može biti znak

odbacivanja ili infekcije, a proteinurija može ukazivati na povrat osnovne bubrežne bolesti ili reakciju odbacivanja (125,126,173-176).

Sniženje parametara u hemogramu može biti uzrokovano krvarenjem, a citopenija infekcijom ili djelovanjem imunosupresivnih lijekova (npr. mikofenolat mofetil, sirolimus). Razvoju anemije također pogoduju inhibitori konvertaze angiotenzina i blokatori angiotenzinskih receptora, dok policitemija može biti izazvana stenozom arterije presatka. Poremećaj jetrene funkcije česta je pojava nakon presađivanja bubrega. Obično je umjeren i prolazan, a nastaje kao posljedica toksičnog djelovanja lijekova, dok teži oblici jetrenog oštećenja zahtijevaju modifikaciju imunosupresivnog liječenja i dodatna ispitivanja. Hiperkalijemija je najčešće izazvana inhibitorima kalcineurina, a hipokalijemija diureticima Henleove petlje. Hipofosfatemija je česta pojava u prvim mjesecima nakon presađivanja bubrega, a u kasnijem tijeku je najvjerojatnije uzrokovana tercijarnim hiperparatireoidizmom. Blaga hiperkalcijemija većinom je posljedica ostatnog hiperparatireoidizma. Hipomagnezijemija može biti izazvana inhibitorima kalcineurina, a hiperkloremijska metabolička acidoza, koja se javlja uglavnom u blažem obliku, može imati brojne uzroke (125,126,173,174).

Kod hiperakutne i akcelerirane akutne reakcije odbacivanja, laboratorijski se mogu utvrditi pokazatelji intravaskularne koagulacije. Potrebna je patohistološka potvrda reakcije odbacivanja, jer se diferencijalno dijagnostički može raditi o trombozi krvnih žila presatka, koja obično ima asimptomatski tijek i zahtijeva kiruršku intervenciju. Kod reakcije odbacivanja posredovane protutijelima mogu se, ponavljanjem križne probe između darivatelja i primatelja, dokazati specifična protutijela protiv darivatelja (125,126,173).

Trombotska mikroangiopatija može biti lokalizirana u bubrežnom presatku ili se može razviti generalizirani hemolitičko-uremijski sindrom (HUS). HUS se može očitovati pogoršanjem funkcije presatka, uz laboratorijske pokazatelje intravaskularne koagulacije te karakteristični nalaz arteriolopatije i intravaskularnih tromba na bioptatu presatka. Potrebno je isključiti odbacivanje posredovano protutijelima na temelju patohistološke analize bioptata presatka, te toksično djelovanje lijekova, prvenstveno inhibitora kalcineurina, OKT3 ili sirolimusa (125,126,173).

1.5.2. Slikovne metode prikaza presatka i njegove funkcije

Ultrazvučni pregled rutinska je metoda za praćenje presatka i rano otkrivanje komplikacija. Konvencionalnim i Color Doppler ultrazvučnim pregledom, kao i nuklearno-medicinskim pretragama, mogu se analizirati morfologija i funkcija presatka. Ove metode su zamijenile standardnu intravensku urografiju. Pregled kompjuteriziranom tomografijom daje odlične anatomske podatke, međutim bolesnik se izlaže ionizirajućem zračenju i najčešće, primjeni nefrotoksičnog jodnog kontrasta, a izvođenje pretrage je kompliciranije i skuplje. Rjeđe se koristi pregled magnetskom rezonancom, uz relativno netoksično kontrastno sredstvo gadolinij. Ova pretraga također daje odlične anatomske podatke, a uz to može neinvazivno prikazati velike krvne žile i funkciju presatka. Ponekad je za dokazivanje komplikacija na mokraćovodu i ureterocistoneostomiji neophodna anterogradna pijelografija, retrogradna urografija ili druge metode prikaza. Propuštanje mokraće iz nepotpuno zatvorenog mokraćnog mjehura (urinska fistula) može se dokazati rentgenskom ili radionuklidnom cistografijom (174,176, 179).

Dupleks ultrazvučni pregled kombinira dvodimenzionalnu sliku s podacima o protoku krvi, koji se prikazuje bojom, pulsnim ili «power» Dopplerom. Dupleks

ultrasonografijom mjeri se frekvencija i energija Dopplerovog pomaka od odjeka koji se odbijaju od krvi (eritrocita) koja prolazi kroz žile, čime se može odrediti protok krvi, njegova brzina i smjer. Najčešće se izračunava indeks otpora (RI, prema engl. resistive indeks) dijeljenjem razlike najveće sistoličke brzine (PSV, prema engl. peak systolic velocity) i brzine na kraju dijastole s najvećom sistoličkom brzinom. Kod pulsatilnog indeksa (PI, prema engl. pulsatility index) razliku najveće sistoličke brzine i brzine na kraju dijastole dijeli se s prosječnom brzinom. Oba indeksa obično se povećavaju kod reakcija odbacivanja, ali i kod drugih patoloških stanja (176-178).

Za dinamičku scintigrafiju presatka danas se većinom koristi radionuklid tehnecija ^{99m}Tc, s kojim je obilježen merkaptoacetiltriglicin (MAG-3). Tijekom ispitivanja analizira se perfuzijska (angiografska) faza, te parenhimska i ekskretorna faza, koje se prikazuju u obliku krivulje, tzv. renograma. Indeks perfuzije izračunava se omjerom između protoka krvi kroz ilijačnu arteriju i presadak. Modifikacijom ove metode, u našoj se ustanovi izračunava omjer protoka krvi između distalnog dijela aorte i presatka uz korekciju vremenskog pomaka, čime je dobivena veća pouzdanost i reproducibilnost. Praćenjem indeksa perfuzije može se utvrditi razvoj akutne reakcije odbacivanja (patološko povećanje indeksa perfuzije), dok suzbijanje reakcije odbacivanja dovodi do njegovog ponovnog smanjenja, odnosno normalizacije (180-182).

Slikovnim metodama može se utvrditi povećanje bubrežnog presatka, koje se javlja kod većine akutnih procesa i nespecifičan je pokazatelj poremećene funkcije presatka. Proširenje odvodnog kanalnog sustava može se prikazati kod opstrukcije ili poslijeoperacijskog edema na ureterocistoneostomiji, kod punog mokraćnog mjehura, reakcije odbacivanja, infekcije ili može biti znak ranije opstrukcije. Dokaz

nakupljanja tekućine oko presatka može ukazivati na limfokelu, urinom, hematom ili apsces. Posljedično tome može se razviti hidronefroza i/ ili oticanje noge.

Akutna tubularna nekroza dovodi do smanjenja glomerularne filtracije, opstrukcije tubula staničnim debrisom, prodora primarne mokraće kroz oštećene membrane proksimalnih tubula i porasta tlaka u međustaničnom prostoru. Slikovnim metodama prikazivanja presatka može se utvrditi zadovoljavajuću prokrvljenost, koja je u nesrazmjeru sa smanjenim izlučivanjem mokraće. Dupleks ultrazvučnim pregledom može se dokazati povišen indeks otpora i smanjen ili obrnut dijastolički protok krvi. Međutim, do porasta indeksa otpora mogu dovesti i druga patološka stanja (176,178). Na dinamičkoj nefroscintigrafiji može se kod akutne tubularne nekroze vidjeti zadovoljavajuća perfuzija i očuvano nakupljanje radiofarmaka u presatku, ali ne postoji izlučivanje radiofarmaka u odvodni sustav i mokraćni mjehur. Zbog slabog plazmatskog klirensa radiofarmaka, vidljiva je i jaka pozadinska aktivnost. Indeks perfuzije je većinom u granicama normale (180,181). Međutim, niti ovom metodom ne može se sa sigurnošću razlučiti akutnu tubularnu nekrozu od reakcije odbacivanja ili toksičnog djelovanja lijekova.

Kod akutne reakcije odbacivanja, slikovne metode ispitivanja funkcije presatka pokazuju izrazito oslabljenu ili odsutnu perfuziju presatka. Ultrazvučni pregled može pokazati povećanje presatka, nejasnu kortikomedularnu granicu, smanjenu ehogenost bubrežnog sinusa, zadebljanje urotela, izbočenje hipoehogenih medularnih piramida, povećanu ili smanjenu ehogenost kore i prisustvo heterogenih područja povećane ehogenosti, koja su najvjerojatnije fokusi krvarenja. Indeks otpora (RI) i pulsatilni indeks (PI) obično se povećavaju. Na dinamičkoj scintigrafiji uočava se smanjena perfuzija presatka (povišen indeks perfuzije), usporen prikaz presatka, slabo nakupljanje izotopa u parenhimu te jaka pozadinska aktivnost zbog smanjenog

klirensa. Međutim, ovim pretragama ne može se sa sigurnošću dokazati akutna reakcija odbacivanja, jer brojne promjene mogu biti odraz drugih komplikacija (176,180,181).

Kod kronične nefropatije presatka postupno slabi njegova funkcija. Ultrazvučni pregled otkriva umanjen presadak sa stanjenom, često ehogenijom korom, te nespecifični porast RI. Dinamička nefroscintigrafija pokazuje oslabljenu perfuziju presatka (povišen indeks perfuzije), pomak vrha renograma udesno i oslabljeno izlučivanje radiofarmaka. Glomerularnu filtraciju može se odrediti dietilentriaminopentaoctenom kiselinom (DTPA) ili etilendiaminotetraoctenom kiselinom (EDTA), koje su označene radioizotopom, a kojima klirens odgovara klasičnom klirensu inulina (176,180,181).

Diferencijacija između akutne tubulske nekroze, akutne reakcije odbacivanja i toksičnog djelovanja lijekova nije moguća na temelju kliničkih pokazatelja i slikovnih metoda prikaza presatka. Neophodno je učiniti patohistološku analizu bioptata.

1.5.3. Patohistološki pokazatelji reakcije odbacivanja

Strukturne promjene na bubrežnom presatku može otkriti jedino patohistološka analiza bioptata. Ona je indicirana kod nejasnog pogoršanja ili odgođenog preuzimanja funkcije presatka, radi otkrivanja moguće reakcije odbacivanja ili drugih patoloških stanja. Većinom se radi ultrazvukom vođena biopsija bubrega pod lokalnom anestezijom. Već se analizom smrznutog preparata pod svjetlosnim mikroskopom, koja se vrši neposredno nakon biopsije, mogu diferencirati histološki pokazatelji koji govore u prilog reakcije odbacivanja. Preostali bioptat priprema se standardnim postupkom za analizu pod svjetlosnim, imunofluorescentnim i elektronskim mikroskopom.

Za opis patohistoloških promjena na bioptatu bubrežnog presatka dogovorno se koristi međunarodna klasifikacija (Banff), koja je revidirana 2007. g. (183). Ovom patohistološkom klasifikacijom razlikuje se šest kategorija: 1. normalan nalaz, 2. promjene posredovane protutijelima: odlaganje C4d bez morfoloških značajki akutnog odbacivanja, akutnu i kronično aktivnu reakciju odbacivanja posredovanu protutijelima, 3. granične promjene, 4. reakciju odbacivanja posredovanu limfocitima T, akutnu i kronično aktivnu, 5. intersticijsku fibrozu i tubularnu atrofiju (raniji naziv kronična nefropatija presatka), 6. ostalo.

Akutna reakcija odbacivanja je najčešće staničnog tipa. Karakterizirana je intersticijskim infiltratom mononuklearnim stanicama, ponekad i eozinofilima, te prekidom tubularne bazalne membrane infiltrirajućim stanicama (tubulitis). Imunohistološki pregled pokazuje veći broj infiltriranih mononuklearnih stanica, koje su pozitivne na MHC molekule razreda II i IL-2R. Akutnu humoralnu reakciju odbacivanja, ili reakciju odbacivanja posredovanu protutijelima, karakterizira bubrenje endotela kapilara, fibrinoidna nekroza arteriola, fibrinski trombi u glomerularnim kapilarama, te u teškim slučajevima jasna kortikalna nekroza. Humoralnu reakciju odbacivanja češće prati teški vaskulitis, glomerulitis s neutrofilima u glomerularnim i peritubularnim kapilarama te intersticijska krvarenja (125-127).

Ponekad se histološki teško može razlikovati akutnu reakciju odbacivanja posredovanu protutijelima od teške akutne reakcije odbacivanja staničnog tipa, a tumačenje nalaza dodatno otežava činjenica da se obje reakcije mogu odvijati istodobno. Pored toga, u oko 25% slučajeva poremećene funkcije presatka, koja je barem djelomično posljedica reakcije odbacivanja posredovane protutijelima, histološki nalaz ukazuje samo na reakciju odbacivanja staničnog tipa ili akutno

tubularno oštećenje. Humoralna reakcija odbacivanja posredovana je protutijelima koja mogu aktivirati klasični put aktivacije komplementa. Karakterizirana je odlaganjem fragmenata komplementa, prevladavanjem plazma stanica u intersticijskom mononuklearnom infiltratu i prisustvom anti-donorskih protutijela. Ona može također biti izazvana non-HLA protutijelima i anti-endotelnim protutijelima. (125-127). Revizijom kriterija međunarodne klasifikacije Banff 2004. g. dogovoreno je da su za dijagnozu reakcije odbacivanja posredovane protutijelima potrebna tri od sljedeća četiri kriterija: poremećaj funkcije presatka, histološki znaci oštećenja tkiva, pozitivno bojanje na C4d komponentu komplementa i dokaz donor specifičnih protutijela (184,185).

U 30% klinički stabilnih primatelja bubrežnog presatka mogu se naći histološki znaci odbacivanja bez jasnog pogoršanja funkcije presatka. Ove subkliničke reakcije odbacivanja mogu otkriti ponovljene analize bioptata presatka (npr. protokol biopsije). One su većinom blagog intenziteta i mogu se suzbiti povećanjem doze kortikosteroida. Prema rezultatima prvih studija, liječenje subkliničkih reakcija odbacivanja kortikosteroidima poboljšava dugoročno preživljavanje presatka, no nedostaje potvrda sa strane kontroliranih studija (127,186-189). Ponekad se vrlo teško razlikuje akutna reakcija odbacivanja od BK virusne nefropatije, virusnog tubulointersticijskog nefritisa. Nije poznato da li je tubulitis samo odraz upalnog odgovora na virusnu infekciju, ili je ona potakla imunosni odgovor i reakciju odbacivanja. Ova dva stanja treba razlikovati, jer je akutna reakcija odbacivanja uglavnom posljedica preslabe imunosupresije, dok BK virusna nefropatija povoljno reagira na smanjenje imunosupresije. U dokazivanju BK virusne nefropatije koristi se in situ hibridizacija za SV40 bojanje, te određivanje BK virusa u serumu i mokraći PCR metodom (190).

Kroničnu nefropatiju presatka karakteriziraju kronične promjene u arterijama, tubulima, intersticiju i glomerulima, koje su uzrokovane brojnim čimbenicima, uključujući imunosne i neimunosne. Patohistološkom analizom bioptata mogu se otkriti i druga stanja koja uzrokuju poremećaj funkcije presatka, na primjer akutnu tubularnu nekrozu, toksičnost inhibitora kalcineurina, infekciju, novonastalu glomerulopatiju, povrat osnovne bolesti i/ ili pojavu drugih bolesti (125-127).

1.5.4. Imunosno praćenje i nove tehnike u procjeni funkcije presatka

Patohistološka analiza je standardna pretraga za dokazivanje reakcije odbacivanja presatka, međutim niti ona nije bez nedostataka. Postoje individualne razlike u interpretaciji patoloških promjena u bioptatu, a ovisno o mjestu punkcije, istovremeno uzeti bioptati presatka mogu pokazivati različite promjene. Ograničenja sadašnjeg sustava bodovanja postoje u pogledu praga osjetljivosti i specifičnosti, utvrđivanja aktivnosti procesa oštećenja i prognostičkog značaja. Istražuju se nove tehnike koje pored određivanja protutijela usmjerenih protiv stanica presatka i biljega stanične aktivacije, uključuju prikazivanje gena, te određivanje bjelančevina i metabolita u krvi, mokraći i bioptatu presatka.

Prethodno određivanje primateljevog rizika za odbacivanje presatka preduvjet je za primjenu individualno dozirane imunosupresije. Rutinski se prije presađivanja ispituje da li u primatelja postoje anti-HLA protutijela (PRA). Prisustvo limfocitotoksičnih protutijela izotipa IgG usmjerenih protiv HLA molekula razreda I, osobito ako uz njih postoje i protutijela na molekule razreda II, ukazuje na lošije preživljavanje presatka (191,192). Usprkos tome, dobra podudarnost u HLA-A, HLA-B i HLA-DR antigenima te odsustvo anti-HLA protutijela ne garantira da neće doći do reakcije odbacivanja. To ukazuje na činjenicu da neki drugi antigeni mogu

posredovati ovu reakciju (193). Primjerice, MICA i MICB (prema engl. major histocompatibility complex class I- related chain A i B) su polimorfni geni koji kodiraju molekule koje su slične molekulama MHC razreda I, a izražavaju se na površini epitelnih stanica i stimuliraju proizvodnju protutijela. Ranija senzibilizacija primatelja bubrega na MICA antigene udružena je s povećanom učestalošću gubitka presatka, uključujući i bolesnike s dobrom podudarnošću u HLA sustavu (194,195). Pokazalo se i da je povećan izražaj MICB u bubrežnom presatku udružen s indukcijom izražaja antigena HLA razreda II, leukocitnom infiltracijom te staničnim stresom, što može značajno pridonijeti aloimunosnom odgovoru (196). U tijeku su ispitivanja utjecaja drugih non-HLA protutijela na reakciju odbacivanja presatka. Ona mogu biti usmjerena na različite antigene sporednog sustava tkivne podudarnosti, kao što su primjerice receptori na endotelu krvnih žila i adhezijske molekule. Budući da non-HLA protutijela mogu aktivirati komplement, induciraju čitav niz različitih mehanizama oštećenja presatka, što ukazuje na složenost njihovog djelovanja u akutnim i kroničnim reakcijama odbacivanja (197,198). Do sada je poznato da neka protutijela ne izazivaju odbacivanje kao primjerice prijetransplantacijsko prisustvo IgA-anti-Fab protutijela, koja zaštićuju presadak i smanjuju učestalost reakcije odbacivanja (199).

Mogu se određivati brojni biljezi stanične aktivacije u krvi, mokraći ili bioptatu presatka. Ispituje se značaj raznih bjelančevina ili citokina, primjerice topljive CD30 molekule, cirkulirajućeg topljivog IL-2R te topljivih adhezijskih molekula (200,201,202). Dosadašnja ispitivanja pokazuju da se određivanjem razine topljive CD30 molekule, biljega aktivacije limfocita, već u prvom tjednu nakon presađivanja može razlikovati bolesnike koji će razviti reakciju odbacivanja od onih s urednim kliničkim tijekom. Ovo je osobito važno kod bolesnika s akutnom

tubularnom nekrozom (200). Uočeno je i da povećanje serumskog CD30 i neopterina tijekom prve godine nakon presađivanja ukazuje na kasniji razvoj kronične nefropatije presatka (203).

Aktivacija stanica pojačava izražaj gena čiji su proizvodi važni za razaranje presatka. Povećana je razina glasničke ribonukleinske kiseline (mRNK), prvenstveno za proapoptotične tvari kao što su perforin, granzim B i Fas-L, u krvi, mokraći ili bioptatu presatka (204-208). Drugi značajan gen je Foxp3, transkripcijski regulator koji inducira nastanak fenotipa regulacijskih limfocita T. Ispitivanja su pokazala da razina granzima B i Foxp3 u mokraći ima dijagnostički i prognostički značaj u bolesnika s akutnim staničnim odbacivanjem presatka. Bolesnici s višom razinom glasničke RNK za Foxp3 (Foxp3 mRNK), imaju veće izglede za uspješno suzbijanje akutne reakcije odbacivanja (209). Foxp3 CD4 limfociti T često se nađu u presatku tijekom reakcije odbacivanja, međutim smatra se da imaju i zaštitnu ulogu te da mogu inducirati toleranciju prema presatku (210). Tribbles-1 je biljeg antigen predočnih i endotelnih stanica. Izražaj Tribbles-1 značajno je povećan u krvi i tkivu presatka, ali ne i u mokraći bolesnika s kroničnom protutijelima posredovanom reakcijom odbacivanja (211). Genotipska razlika u aktivnosti enzima, koji su važni za metabolizam imunosupresivnih lijekova, može uzrokovati velike razlike u farmakokinetici ovih lijekova. Na primjer, aktivnost enzima tiopurinmetiltransferaze ponekad je toliko snižena, da je potrebno smanjiti dozu azatioprina na svega jednu desetinu (212). T-331C polimorfizam UGT1A9 gena određuje farmakokinetiku mikofenolne kiseline, a genotip za kalcineurin određuje nefrotoksičnost ciklosporina (213,214).

U bubrežnim bioptatima dokazani su brojni geni koji ukazuju na razvoj kroničnog odbacivanja prije pojave kliničkih i histoloških pokazatelja kroničnog

oštećenja. Promjene izražaja gena predstavljaju objektivnu mjeru za kvantifikaciju bioloških procesa. Pored prikazivanja izražaja gena, predmet ispitivanja su različite bjelančevine i metaboliti, koji su različito zastupljeni kod uredne funkcije presatka, reakcije odbacivanja, upale ili kronične nefropatije presatka. Za određivanje izražaja gena (transkriptomika), bjelančevina (proteomika) i metabolita (metabolomika) koriste se brojne nove tehnologije, pojedinačno ili u kombinaciji, koje uključuju DNK microarray analize, PCR, multidimenzionalnu gel-elektroforezu, novije metode spektroskopije, tehnike s magnetskom rezonancom, radionuklidima, laserskom svjetlosti i kulturom stanica. Ovim metodama pokušavaju se otkriti, kvantificirati i pratiti biomarkeri određenih fizioloških ili patofizioloških stanja. Biomarkeri su biološke molekule (geni, bjelančevine/ peptidi, metaboliti), čije prisustvo označava patološko stanje ili visoku sklonost, tj. rizik da će se razviti određena bolest ili specifično patološko stanje. Oni se mogu dokazati u stanicama, tkivima i tjelesnim tekućinama. Navedene metode omogućavaju istovremeno određivanje stotina tisuća biljega, primjerice RNK transkripata, staničnih proizvoda, topljivih citokina i bjelančevina, koji prikazuju složeni obrazac brojnih međudjelovanja. Pouzdanost određivanja ovih biljega i sposobnost razlikovanja imunosne reakcije odbacivanja od drugih uzroka upale ili oštećenja presatka, trebaju dokazati kontrolirane studije. Genomika, proteomika i metabolomika otvaraju nove mogućnosti ranog otkrivanja i liječenja raznih bolesti, uključujući reakciju odbacivanja te druge uzroke oštećenja funkcije presatka (215-219).

Međutim, ove metode su vrlo skupe, vremenski i kadrovski zahtjevne, izvode se u visoko specijaliziranim laboratorijima i nisu komercijalno dostupne. Za naše uvjete relativno jednostavna, jeftina, a vrlo precizna metoda je određivanje proliferativnog potencijala stanica metodom mjerenja zastupljenosti stanica u

pojedinoj fazi staničnog ciklusa pomoću protočne citometrije. Pored toga, protočnim citometrom može se utvrditi zastupljenost imunosnih stanica koje nose aktivacijske biljege, kao što su HLA-DR, IL-2R, Fas-L, citolitičke medijatore kao što su perforin i granzim B, te druge funkcijski značajne molekule. Ovim metodama ne mjere se izravno parametri funkcije presatka, nego aktivacijska razina imunosnog sustava, čime se mogu utvrditi bolesnici koji imaju veću sklonost za razvoj reakcije odbacivanja presatka.

1.5.5. Stanični diobeni ciklus

U novije vrijeme se protočna citometrija razvila se u jednu od temeljnih imunoloških metoda. Pored imunofenotipizacije stanica, protočna citometrija može se koristiti i za relativno određivanje količine DNK u stanicama, mjerenjem zastupljenosti stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa. Ovom metodom mogu se dobiti značajni podatci o utjecaju raznih čimbenika, primjerice prijenosa gena ili primjene lijekova, na stanični ciklus. Pod staničnim diobenim ciklusom podrazumijeva se niz precizno kontroliranih staničnih zbivanja, koja vode u podvostručenje staničnih organela i DNK, te njihovu pravilnu raspodjelu u dvije nove stanice kćeri. Stanice bez jezgre (prokarioti) dijele se binarnom diobom, dok se stanični ciklus kod stanica s jezgrom (eukarioti) može podijeliti na dva razdoblja, interfazu i fazu mitoze. Tijekom interfaze stanica raste i akumulira hranjive tvari potrebne za daljnju diobu stanice, a tijekom mitoze stanica se dijeli u dvije jednake stanice kćeri. Diobeni ciklus temeljni je životni proces, budući da pomoću njega od oplođene jajne stanice nastaje zreli, odrasli organizam, a služi i za obnavljanje stanica, tkiva i organa (220).

1.5.5.1.Faze staničnog ciklusa

Diobeni ciklus prolazi četiri faze: G_1 faza (G, prema engl. gap), S faza (sinteza), G_2 faza i M faza (mitoza) (slika 5, tablica 3). Sama M faza sastoji se od dva tijesno povezana procesa: mitoze u užem smislu, tijekom koje se stanični kromosomi podijele između stanica kćeri, i citokineze, u kojoj se stanična citoplazma podijeli na dva jednaka dijela, tvoreći odvojene stanice. Početak svake faze usklađen je s dovršetkom prethodne, tako da je prolazak kroz ciklus visoko kontroliran proces. Stanice koje su se privremeno, na kraće ili duže vrijeme zaustavile u diobi, nalaze se u stanju mirovanja koje se naziva G_0 faza (220).

Slika 5: Shematski prikaz staničnog ciklusa: vanjski prsten: I = interfaza, M = mitoza; unutarnji prsten: M = mitoza, G_1 = gap 1, G_2 = gap 2, S = sinteza; izvan prstena: G_0 = gap 0/ mirovanje (u ovom prikazu uvećano je trajanje mitoze u odnosu na druge faze)

Tablica 3: Faze staničnog diobenog ciklusa

Stanje	Faza	Opis
Mirovanje	Gap 0 (G_0)	Faza mirovanja. Stanica je izašla iz diobenog ciklusa i prestala se dijeliti.
Interfaza	Gap 1 (G_1)	Stanice rastu. Kontrolni mehanizmi G_1 kontrolne točke osiguravaju da je sve spremno za sintezu DNK.
	Sinteza (S)	Udvostručenje jezgrine DNK.
	Gap 2 (G_2)	Stanice nastavljaju s rastom. Kontrolni mehanizmi G_2 kontrolne točke osiguravaju da je sve spremno za ulazak u M fazu i diobu.
Stanična dioba	Mitoza (M)	Rast stanica je zaustavljen, a stanična energija usmjerena na pravilnu diobu u dvije stanice kćeri. Kontrolna točka u sredini mitoze (kontrolna točka metafaze) osigurava da je stanica spremna za dovršenje stanične diobe.

Nakon stanične diobe, svaka od stanica kćeri ulazi u interfazu novog ciklusa. Tijekom ove faze stanice rastu, sintetiziraju RNK i proizvode bjelančevine, zbog čega je stanični ciklus relativno dug, pa u brzo proliferirajućim tkivima sisavaca traje po 12 ili više sati. Na temelju molekularnih zbivanja u stanici, interfaza se može podijeliti na četiri dijela: Gap 0 (G_0), Gap 1 (G_1), S faza (faza sinteze), Gap 2 (G_2).

- Stanice mogu iz G_1 faze ući u G_0 fazu, fazu mirovanja ili postmitotičnu fazu, gdje mogu ostati tijekom dugog razdoblja, a neke stanice i zauvijek. To je često kod stanica koje su visoko diferencirane (npr. živčane stanice) ili u stanjima stanične starosti kada stanice zbog skraćenja telomera ili oštećenja DNK gube diobeni potencijal. Ova stanja rezultiraju prestankom staničnog dijeljenja ili apoptozom, programiranom staničnom smrti.
- G_1 faza traje od završetka M faze do početka sinteze DNK. Tijekom ove faze snažno se aktiviraju mehanizmi sinteze bjelančevina u stanici, koji su tijekom M faze zakočeni. Sintetiziraju se brojni enzimi koji su potrebni u S fazi, prvenstveno za replikaciju DNK. Trajanje G_1 faze jako varira.
- Na G_1 fazu nastavlja se S faza u kojoj započinje sinteza jezgrine DNK. Po završetku S faze svi su kromosomi udvostručeni. U ovoj se fazi proizvode histoni, dok je vrlo usporeno prepisivanje RNK i sinteza bjelančevina. Sinteza histona je neophodna za pakiranje DNK i njezinu kondenzaciju u kromosome.
- Stanica potom ulazi u G_2 fazu koja traje sve do mitoze. I u ovoj fazi se sintetizira značajna količina bjelančevina, potrebnih za izgradnju mikrotubula, neophodnih za proces mitoze.

M faza traje relativno kratko. DNK, kondenzirana u kromosome, hvata se za diobeno vreteno koje od svakog para kromosoma odvaja po jednu kromatidu i vuče je na suprotne polove stanice. Mitozom i citokinezom stanica se dijeli na dvije genetski identične stanice, koje se po genetskom materijalu u potpunosti podudaraju sa stanicom majkom iz koje su nastale. Pogreške u mitozi mogu dovesti do smrti stanice apoptozom, a ukoliko u obliku mutacija DNK zaostanu u živućoj stanici, mogu uzrokovati razvoj karcinoma ili nastanak nasljednih bolesti (220,221).

1.5.5.2. Regulacija staničnog ciklusa

U jednostaničnim organizmima brzina rasta i odluka o početku diobe isključivo ovise o raspoloživosti hranjivih tvari u okolišu, dok su u višestaničnim organizmima procesi rasta i diobe stanica dodatno specifično regulirani čimbenicima rasta. Ovakva regulacija im omogućava međusobnu koordinaciju u početnoj diferencijaciji u tkiva i organe tijekom rasta i razvoja, a kasnije uspostavu homeostaze i morfostaze odraslog višestaničnog organizma. Regulacija staničnog ciklusa uključuje procese koji su neophodni za preživljavanje stanice, kao što su detekcija i popravak oštećenja na genima te sprječavanje nekontrolirane diobe stanice. Kontrola nad provođenjem temeljnih funkcija staničnog ciklusa poglavito se odvija preko dviju skupina bjelančevina, ciklina i ciklin-ovisnih kinaza (CDKs, prema engl. cyclin-dependent kinases). Ciklini su nazvani tako, jer ciklički prolaze faze sinteze i nagomilavanja u citoplazmi, te nagle degradacije u određenoj fazi staničnog ciklusa. Oni su regulacijske podjedinice koje se vežu za CDK molekule, čime ih pretvaraju u aktivni oblik enzima, koji fosforilacijom ciljnih bjelančevina potiču diobu (220-222,224).

Ciklin D je prvi ciklin koji se proizvodi u staničnom ciklusu kao odgovor na vanjske signale (npr. čimbenike rasta). On se veže za CDK4, stvarajući aktivni kompleks koji dovodi do aktivacije E2F, što rezultira prepisivanjem različitih gena kao što su ciklin E, ciklin A, DNK polimeraza, timidin kinaza. Ciklin E se veže za CDK2, a ovaj kompleks potiče prijelaz od G_1 na S fazu staničnog ciklusa. Drugi stvoreni kompleks ciklin B-CDK1 potiče prijelaz G_2 u M fazu. Aktivacija ovog komleksa uzrokuje kidanje jezgrine membrane i ulazak u profazu, prvu podfazu mitoze, a naposljetku deaktivacija kompleksa ciklin B-CDK1 uzrokuje izlazak stanice iz faze mitoze (225,226).

1.5.5.3. Inhibitori staničnog ciklusa

Dvije porodice gena, *cip/kip* porodica i INK4a/ARF (prema engl. inhibitor of kinase 4/ alternative reading frame) sprječavaju napredovanje kroz faze staničnog diobenog ciklusa. Budući da ovi geni sudjeluju u sprječavanju nastanka tumora, nazivaju se tumorski supresori. *Cip/kip* porodica gena obuhvaća gene *p21*, *p27 i p57*, koji vezivanjem i inaktiviranjem ciklin-CDK kompleksa zaustavljaju stanični ciklus u G_1 fazi. Pored toga, p21 aktivira p53 čiji izražaj normalno potiče oštećenje DNK, primjerice nakon radioaktivnog ozračivanja stanice. Bjelančevina p27 aktivira stvaranje citokina TGF-β, koji u mnogim tkivima služi kao inhibitor rasta. INK4a/ARF porodica obuhvaća p16INK4a, koji se veže za CDK4 i zaustavlja stanični ciklus u G_1 fazi, te p14arf koji sprječava p53 degradaciju. Bjelančevina p53 je jedan od najznačajnijih tumorskih supresora. Ova bjelančevina, nakon detekcije oštećenja DNK, aktivira mehanizme enzimatskog popravka nukleotidnog slijeda. Ukoliko popravak uspije, p53 dozvoljava daljnju progresiju stanice kroz diobeni ciklus, međutim, ukoliko pokušaj popravka oštećenja propadne, on pokreće mehanizam programirane stanične smrti. Na taj način se značajno smanjuje učestalost kancerogeneze jer se ne dozvoljava dioba stanice s oštećenom DNK.

1.5.5.4. Kontrolne točke

Zbog velike biološke važnosti diobenog ciklusa i mogućih teških posljedica grešaka koje bi mogle nastati tijekom diobe, stanice su razvile regulacijske mehanizme za praćenje i reguliranje napredovanja staničnog ciklusa. Molekulsko-biološka istraživanja onkogena, tumor-supresijskih gena, kao i drugih regulacijskih bjelančevina diobenog ciklusa, pokazala su da su u G_1 i G_2 fazi smještene kontrolne točke koje provjeravaju pripremljenost stanica za ulazak u iduću fazu ciklusa. Jedna

od najvažnijih provjera odvija se u G_1 fazi, dakle prije početka sinteze nove DNK, kojom se utvrđuju moguća oštećenja DNK predloška. Ukoliko se ustanovi nenormalna struktura DNK lanca, zaustavlja se napredovanje staničnog ciklusa u S fazu, aktiviraju se mehanizmi za popravak, a tek se onda dozvoljava udvostručenje DNK. Ovaj mehanizam je izuzetno važan, budući da bi replikacija oštećene DNK rezultirala mutacijama, koje bi mogle voditi u stvaranje malignih klonova ili staničnu smrt (220,221,223).

1.5.5.5. Poremećaji regulacije staničnog ciklusa

Budući da tumor-supresijski geni (proteini) kontroliraju prolazak stanice kroz diobeni ciklus te ga u slučaju potrebe mogu i zaustaviti, njihova mutacija može uzrokovati nekontrolirano množenje stanice i razvoj tumora. Trajanje staničnog ciklusa u tumorskim stanicama je jednako ili duže od onoga u normalnim stanicama, međutim, za razliku od normalnog, zdravog tkiva, udio stanica koje se nalaze u aktivnoj staničnoj diobi raste u odnosu na udio stanica u mirujućoj G_0 fazi. Broj tumorskih stanica stalno se povećava, jer je prirast novonastalih stanica veći od broja stanica koje stare i umiru apoptozom. Budući da je DNK tijekom diobe stanica najpodložnija oštećenjima, radioaktivno zračenje i lijekovi protiv karcinoma djeluju prvenstveno na stanice koje ulaze u stanični ciklus. Nakon odstranjenja značajne količine tumorske mase (engl. debulking), povećana raspoloživost hranjivim tvarima, kisikom i čimbenicima rasta omogućava značajnom broju preostalih tumorskih stanica da iz G_0 uđu u G_1 fazu diobenog ciklusa. Stoga je tada potrebno bolesnika ponovno podvrgnuti zračenju ili kemoterapiji, čime se ubijaju stanice koje su ušle u stanični diobeni ciklus (225).

Kod presađivanja organa također se koriste lijekovi koji inhibiraju stanični diobeni ciklus. Jedan od najboljih primjera je azatioprin, imidazolski derivat 6-merkaptopurina, koji se ugrađuje u staničnu DNK, te time sprječava sintezu purinskih nukleotida. Rezultat je inhibicija replikacije gena i nedostatna aktivacija limfocita. Za razliku od azatioprina, mikofenolna kiselina djeluje specifično na aktivirane limfocite, u kojima reverzibilnom inhibicijom inozin monofosfat dehidrogenaze ometa sintezu purina i stvaranje gvanozin nukleotida. Sirolimus i everolimus vezivanjem za FKBP stvaraju kompleks koji inhibira bjelančevinu TOR, čime sprječavaju djelovanje čimbenika rasta na aktivirane limfocite. Zbog toga se smanjuje proliferacija stanica ovisna o citokinima, zbog čega ostaju zaustavljene u G_1 i S fazi diobenog ciklusa (86,87,90,91).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja, prikazanih u ovoj disertaciji, bio je obrada kliničkih podataka o liječenju presađivanjem bubrega u KBC-u Rijeka u proteklom gotovo 25-godišnjem razdoblju. Pored toga, u prospektivnom dijelu istraživanja, pokušali smo analizirati imunosnu reaktivnost bolesnika s presađenim bubregom mjerenjem imunosnih parametara, te bolje upoznati djelovanje jednog od rutinski korištenih imunosupresivnih lijekova u liječenju ovih bolesnika, daklizumaba.

Nakon uvođenja monoklonskih protutijela protiv IL-2R (baziliksimab, daklizumab), značajno se smanjila učestalost akutnih kriza odbacivanja u primatelja bubrežnog presatka u KBC-u Rijeka. Razina imunosupresije u obrnutom je srazmjeru s imunosnom reaktivnošću. Osnovna dvojba u liječenju bolesnika s presađenim bubregom je doziranje imunosupresivnih lijekova, budući da prekomjerna imunosupresija može dovesti do pojave neželjenih učinaka, osobito srčanožilnih, infektivnih i malignih bolesti, dok s druge strane nedostatna imunosupresija dovodi do odbacivanja organa. U nastojanju da se i dalje poboljša rezultate liječenja te da se smanji primjena prekomjerne imunosupresije i njezinih posljedica, novom metodom želi se, pored dosadašnjih metoda imunološkog i kliničkog praćenja, indirektno i kvantitativno pokazati biološki učinak lijeka daklizumaba, tj. suzbijanje reaktivnosti limfocita nakon njegove primjene.

Analizom staničnog ciklusa limfocita periferne krvi tehnikom protočne citometrije, kvantitativno smo određivali djelovanje daklizumaba na proliferaciju limfocita T primatelja bubrežnog presatka. Analiziran je i učinak samog lijeka korištenjem različitih koncentracija daklizumaba *in vitro* na uzorcima krvi bolesnika i zdravih darivatelja krvi. Određivali smo postotnu zastupljenost limfocitnih podvrsta te aktivacijskog biljega CD25 na T limfocitnim populacijama periferne krvi ($CD3^+$,

$CD4^+$ i $CD8^+$). Dobiveni rezultati nakon primjene daklizumaba uspoređeni su s uzorkom krvi ispitanika prije njegove primjene, neposredno prije presađivanja bubrega, te s djelovanjem na limfocite periferne krvi zdravih darivatelja krvi i bolesnika na liječenju redovitom dijalizom radi isključivanja djelovanja uremičnih toksina. Eksperimentalne podatke korelirali smo s kliničkim podatcima bolesnika kojima je presađen bubreg u razdoblju od dvije godine, a koji su praćeni od jedne do dvije i pol godine nakon presađivanja bubrega.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

3.1.1. Opći podatci o ispitanicima

Proveli smo retrospektivnu analizu kliničkih podataka, dobivenih od bolesnika kojima je presađen bubreg u KBC-u Rijeka u proteklom gotovo 25-godišnjem razdoblju. Pored toga, učinili smo i prospektivno randomizirano istraživanje koje obuhvaća bolesnike podvrgnute presađivanju bubrega u KBC-u Rijeka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. U svih ispitanika, u kojih je primijenjeno monoklonsko protutijelo protiv α lanca IL-2R daklizumab, uzimao se uzorak krvi iz kubitalne vene radi ispitivanja reaktivnosti limfocita periferne krvi.

Kontrolne skupine činili su zdravi muškarci i zdrave negravidne žene te bolesnici sa završnim bubrežnim zatajenjem na liječenju redovitom dijalizom.

Iz ispitivanja su isključeni bolesnici s pozitivnim biljezima na hepatitis B i/ili C radi opasnosti od mogućeg prijenosa na zdravstveno i laboratorijsko osoblje.

3.1.1. Etički aspekti istraživanja

Istraživanjem je osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa - osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost - u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. U ovoj prospektivnoj i djelomično retrospektivnoj studiji korišteni su uobičajeni medicinski podatci, koji su prikupljeni radi upoznavanja imunosnog odgovora bolesnika, u skladu s etičkim i bioetičkim principima, uz osiguravanje privatnosti (medicinske tajne) ispitanika/bolesnika uključenih u istraživanje i zaštite tajnosti podataka. Bolesnici su informirani usmeno i pismeno o ciljevima i procedurama ispitivanja kod primjene daklizumaba, kao i o očekivanim učincima, mogućim prednostima, nedostatcima i

svim potencijalnim rizicima. Pristanak na sudjelovanje u istraživanju bolesnici/ ispitanici potvrdili su potpisivanjem informirane suglasnosti.

3.2. Metode

3.2.1. Analiza podataka o primatelju i darivatelju bubrežnog presatka te samom postupku presađivanja

Podatci su dobiveni iz anamneze, medicinske dokumentacije (povijesti bolesti, otpusna pisma, ambulantni kartoni), računalne baze podataka i registara koji se od prvog dana rada našeg centra vode za svakog bolesnika.

Bilježeni su sljedeći podatci:

- demografski podatci primatelja i darivatelja
- osnovna bubrežna bolest primatelja, metoda i trajanje dijalitičkog liječenja
- ranije presađivanje bubrega, primljene transfuzije krvi
- krvna grupa i HLA tipizacija tkiva primatelja i darivatelja
- protutijela na HLA antigene (PRA) u primatelja
- podudarnost primatelja i darivatelja u krvnoj grupi i HLA antigenima
- vrsta darivatelja, srodstvo s primateljem, uzrok smrti kadaveričnog darivatelja
- hladna ishemija presatka
- prisustvo zaraznih bolesti (lues, virusni hepatitis B ili C, infekcija virusom humane imunodeficijencije i/ili citomegalovirusom) u primatelja i darivatelja bubrežnog presatka

3.2.2. Imunosupresivno liječenje

3.2.2.1. Imunosupresivni lijekovi

U bolesnika je primijenjen standardni imunosupresvini protokol koji se koristi u KBC-u Rijeka, a kojeg čine sljedeći lijekovi:

- antimetabolit *mikofenolna kiselina* (CellCept tvrtke F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Švicarska, ili Myfortic tvrtke Novartis Pharma Stein AG, Stein, Švicarska)
- anti-CD25 monoklonsko protutijelo *daklizumab* (Zenapax tvrtke F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Švicarska)
- kortikosteroid *metilprednizolon* (Solu-Medrol i Medrol tvrtke Pharmacia NV/SA, Puurs, Belgija)
- inhibitor kalcineurina *ciklosporin A* (Sandimmun Neoral tvrtke Novartis Pharma Stein AG, Stein, Švicarska) *ili takrolimus* (Prograf tvrtke Astellas Ireland Co. Ltd., Co. Kerry, Irska)

3.2.2.2. Imunosupresivni protokol

Standardni imunosupresivni protokol koji se koristi u KBC-u Rijeka kod presađivanja bubrega od umrle osobe je sljedeći (tablica 4):

- *Mikofenolat mofetil,* kapsule od 250 mg: dnevna doza je 2 grama, prva doza daje se neposredno prije operacije, uzima se ujutro i navečer, uvijek u isto vrijeme.
- *Daklizumab,* ampule od 25 mg za intravensku primjenu: 1 mg/kg daje se u obliku intravenske infuzije, tijekom 15-30 minuta, neposredno prije operativnog zahvata; ista doza se ponavlja u razmacima od dva tjedna, ukupno do pet puta.

- *Metilprednizolon,* ampule od 40 mg, 125 mg, 250 mg i 500 mg za intravensku primjenu, i tablete od 4 mg, 16 mg i 32 mg: bolesnici dobivaju lijek tijekom kirurškog zahvata, prije anastomoziranja krvnih žila, u dozi od 500 mg, a potom se doza postupno smanjuje (250 mg, 125 mg, 60 mg i 40 mg) do doze održavanja od 0,3 mg/kg na usta. Nastavlja se smanjivanje doze po 4 mg mjesečno, uz eventualno ukidanje nakon šest mjeseci. Lijek se uzima ujutro.
- *Inhibitor kalcineurina,* Sandimmun Neoral kapsule od 25 mg, 50 mg i 100 mg, ili Prograf kapsule od 0,5 i 1 mg; uvodi se postupno, uzima se ujutro i navečer, uvijek u isto vrijeme, a doza se postupno povećava do ciljne razine.

Razina inhibitora kalcineurina određivala se iz pune krvi s EDTA antikoagulansom, enzimatskom imunokemijskom metodom s mišjim monoklonskim protutijelima. Razina ciklosporina određivana je metodom MEIA, a razina takrolimusa metodom EMIT. U prva tri mjeseca ciljna razina C_0 (najniža koncentracija, 12 sati nakon uzimanja lijeka) kod ciklosporina iznosi od 200-250 ng/ml, a ciljna razina C_2 (dva sata nakon uzimanja lijeka) oko 1400-1800 ng/ml. Kod takrolimusa je ciljna razina 10-12 ng/l. Nakon tri do šest mjeseci održava se razina ciklosporina C_0 između 150 i 200 ng/l, odnosno C_2 oko 800-1200 ng/l, nakon jedne godine C_0 iznad 150 ng/l, odnosno C_2 oko 700 ng/l, a dnevna doza lijeka je najmanje 3 mg/kg tjelesne težine. Koncentracija takrolimsua održava se nakon tri do šest mjeseci od 8 do 10 ng/l, a nakon godine dana oko 4 do 8 ng/l. Razina mikofenolne kiseline određivala se iz EDTA plazme metodom EMIT. Terapijski interval je od 6,2 do 12,5 μmol/l.

Pri presađivanju bubrega od starijih darivatelja, u slučajevima oštećenja bubrega, primjerice dugom hladnom ishemijom, odgođenog preuzimanja funkcije presatka, ili primatelja starije životne dobi, odgađa se primjena inhibitora kalcineurina za nekoliko dana. Ciljne razine lijekova su niže, kod primjene ciklosporina oko 150 ng/l, a takrolimusa 6-8 ng/l.

U bolesnika s povećanim rizikom za odbacivanje presatka kao inhibitor kalcineurina primjenjuje se takrolimus, koji se uvodi prvog ili drugog dana po operativnom zahvatu, a ciljni nivo u punoj krvi je oko 12 ng/l. U ovih bolesnika ne ukida se kortikosteroidna terapija.

Kod presađivanja bubrega od živog srodnog darivatelja, mikofenolat mofetil se uvodi tri dana prije presađivanja bubrega, a kortikosteroid se daje samo tijekom operativnog zahvata. Koritkosteroidi se primjenjuju trajno jedino u slučaju nastupa reakcije odbacivanja presatka, a nakon pulsnih doza metilprednizolona.

U slučaju leukopenije, jetrenog, bubrežnog oštećenja ili drugih neželjenih učinaka liječenja, modificira se imunosupresivno liječenje smanjenjem doze lijekova, njihovim ukidanjem ili zamjenom drugim lijekovima.

Rutinski se davala antibiotska zaštita prvih osam do deset dana po operativnom zahvatu, većinom cefalosporin treće generacije. Radi zaštite od gljivičnih infekcija, bolesnici su primali nistatin kapi ili mikonazol oralni gel. Antivirusna profilaksa valganciklovirom davana je u slučajevima kada primatelj nije imao protutijela protiv citomegalovirusa, a u darivatelja su postojali serološki pokazatelji preboljele citomegalovirusne infekcije. Antivirusna profilaksa primjenjivala se i u bolesnika kod kojih je bila potrebna jača imunosupresija, primjerice pulsne doze kortikosteroida ili plazmafereza za suzbijanje reakcije odbacivanja.

Tablica 4: Imunosupresivni protokol u KBC-u Rijeka

	Presadak od umrle osobe	**Stariji darivatelj ili primatelj, oštećen presadak ili odgođeno preuzimanje funkcije**	**Povećan rizik od odbacivanja**	**Presadak od živog srodnog darivatelja**
Prije operativnog zahvata				
Mikofenolat mofetil (CellCept)	1-2 g na usta	1-2 g na usta	1-2 g na usta	3 dana prije op. 2 g dnevno na usta
Daklizumab	1 mg/kg i.v.	1 mg/kg i.v.	1 mg/kg i.v.	1 mg/kg i.v.
Tijekom operativnog zahvata				
Metilprednizolon	500 mg i.v.	500 mg i.v.	500 mg i.v.	500 mg i.v.
Nakon operativnog zahvata				
Mikofenolat mofetil (CellCept)	2 g dnevno, nakon 1 mj. uz takrolimus 1,5 g dnevno	2 g dnevno, nakon 1 mj. uz takrolimus 1,5 g dnevno	2 g dnevno, nakon 1 mj. uz takrolimus 1,5 g dnevno	2 g dnevno, nakon 1 mj. uz takrolimus 1,5 g dnevno
Metilprednizolon (Solu-Medrol)	Postupno smanjivati dozu od 250 mg (125 mg, 60 mg, 40 mg) i.v. do 0,3 mg/kg na usta	Postupno smanjivati dozu od 250 mg (125 mg, 60 mg, 40 mg) i.v. do 0,3 mg/kg na usta	Postupno smanjivati dozu od 250 mg (125 mg, 60 mg, 40 mg) i.v. do 0,3 mg/kg na usta	Samo u slučaju krize odbacivanja pulsne doze
Prednizolon (Medrol)	0,3 mg/kg, nakon 1 mj. smanjivati dozu po 4 mg/mj. uz eventualno ukidanje nakon 6 mj.	0,3 mg/kg, nakon 1 mj. smanjivati dozu po 4 mg/mj. uz eventualno ukidanje nakon 6 mj.	0,3 mg/kg, nakon 1 mj. smanjivati dozu po 4 mg/mj. do doze održavanja od 0,1 mg/kg/dan	Samo nakon pulsnih doza metil-prednizolona, 0,3 mg/kg/dan, nakon 1 mj. smanjivati dozu po 4 mg/mj. do doze održavanja od 0,1 mg/kg/dan
Inhibitor kalcineurina: ciklosporin (Sandimmun Neoral) ili takrolimus (Prograf)	Ciklosporin: 1-2 mg/kg, postupno povećavati dozu do razine od 200-250 ng/l (C_0*), ili oko 1400-1800 (C_2*); Takrolimus: 2 mg uz postupno povećavanje doze do razine od 10-12 ng/l	3. ili 4. dan po op.: Ciklosporin: 1-2 mg/kg, postupno povećavati dozu do razine od 150 ng/l (C_0*), ili oko 800-900 ng/l (C2*); Takrolimus: 2 mg uz postupno povećavanje doze do razine od 6-8 ng/l	1. ili 2. dana po op.: Takrolimus: 2 mg uz postupno povećavanje doze do razine od 12 ng/l	Ciklosporin: 1-2 mg/kg, postupno povećavati dozu do razine od 200-250 ng/l (C_0*), ili oko 1400-1800 (C_2*); Takrolimus: 2 mg uz postupno povećavanje doze do razine od 10-12 ng/l
Daklizumab (Zenapax)	1 mg/kg svaka 2 tj., ukupno do 5 doza	1 mg/kg svaka 2 tj., ukupno do 5 doza	1 mg/kg svaka 2 tj., ukupno do 5 doza	1 mg/kg svaka 2 tj., ukupno do 5 doza

* C_0 je razina inhibitora kalcineurina u punoj krvi 12 sati, a C_2 dva sata nakon posljednje doze lijeka

3.2.3. Metode praćenja bolesnika i funkcije presatka

3.2.3.1. Klinički i laboratorijski parametri

Pored anamnestičkih podataka i fizikalnog pregleda, tijekom praćenja bolesnikovog stanja i funkcije presatka bilježeni su sljedeći parametri:

- tjelesna težina bolesnika; u ranom poslijeoperacijskom tijeku mjerena je na krevet-vagi, a kada je bolesnik mogao ustajati, na podnoj vagi
- tjelesna temperatura
- arterijski krvni tlak
- centralni venski tlak
- dnevna diureza, a u ranom poslijeoperacijskom tijeku i satna diureza na urinski kateter i protezu
- balans tekućine
- izgled i količina dreniranih sekreta, uz biokemijsku ili bakteriološku analizu
- primijenjeni lijekovi, doza i način primjene
- intervencije, primjerice liječenje dijalizom, biopsija presatka

Redovite provjere laboratorijskih nalaza uključuju određivanje hemograma, serumske koncentracije ureje i kreatinina, biljega jetrene funkcije, elektrolita, glikemije, lipidograma, bjelančevina, urata i C-reaktivnog proteina. Rutinski se prati razina inhibitora kalcineurina u punoj krvi. Mokraća se analizira biokemijski, uključujući određivanje koncentracije ureje, kreatinina, natrija i bjelančevina kvantitativno. Pored toga, analizira se nativni sediment mokraće pod svjetlosnim mikroskopom, te obojeni sediment pod faznim mikroskopom. Redovito se obavlja bakteriološki pregled mokraće uz antibiogram urinokulture. Od biljega citomegalovirusne infekcije, u početnom razdoblju praćenja određivala se pp65

antigenemija, a zbog nemogućnosti nabavke reagensa, u daljnjem tijeku određivao se titar protutijela IgG i IgM ELISA metodom te je prikazana citomegalovirusna DNK PCR metodom (229). DNK je izolirana iz pune krvi, a granica detekcije iznosila je 160 kopija/ml.

U bolesnika se rutinski kontrolira elektrokardiogram. U slučaju vrućice rade se bakteriološke analize krvi, mokraće, briseva grla i nosa, dreniranih sekreta ili punktiranih nakupina tekućine, i ponavlja se radiografski pregled grudnih organa.

Funkcija bubrežnog presatka procjenjuje se na temelju laboratorijskih parametara bubrežne funkcije te računskim klirensom kreatinina pomoću Cockcroft-Gaultove formule (175).

3.2.3.2. Slikovne metode prikaza presatka i njegove funkcije

Svakodnevno se rade rutinski konvencionalni i Color Doppler ultrazvučni pregledi bubrežnog presatka. Analizira se veličina i prokrvljenost presatka, eventualno postojanje proširenja pijelokalikarnog sustava ili nakupina slobodne tekućine oko presatka, a mjeri se i indeks otpora na razini interlobarnih arterija presatka.

Morfologija i funkcija presatka rutinski se analizira dinamičkom scintigrafijom s radionuklidom tehnecija ^{99m} Tc, s kojim je obilježen MAG-3, i izračunava se indeks perfuzije.

Kod sumnje na urološku komplikaciju vrše se dodatne pretrage, primjerice intravenska urografija, pregled kompjuteriziranom tomografijom, retrogradna ili anterogradna pijelografija, endoskopski pregled urotrakta te druga ispitivanja ovisno o indikaciji.

3.2.3.3. Neželjene pojave i komplikacije liječenja

Anamnezom, fizikalnim nalazom, kliničko-laboratorijskim pokazateljima i slikovnim metodama prikaza presatka otkrivene su komplikacije i provedeno je liječenje. Bilježene su akutne reakcije odbacivanja, infekcije, kirurške komplikacije, pojava arterijske hipertenzije, hiperlipoproteinemije, šećerne bolesti te druge komplikacije liječenja. Kumulativno preživljavanje presatka i bolesnika analizirano je po metodi Kaplan-Meier.

Kod odgođenog preuzimanja funkcije presatka ili sumnje na akutnu reakciju odbacivanja, učinjena je patohistološka analiza bioptata. Smrznuti bioptat pregledavao se pod svjetlosnim mikroskopom, a nakon standardne pripreme i bojanja, svjetlosnim, imunofluorescentnim i elektronskim mikroskopom. Nalaz se interpretirao prema revidiranoj međunarodnoj klasifikaciji Banff (183).

3.2.4. Imunosno praćenje bolesnika

3.2.4.1. Materijal i reagencije

- Ficoll hipaque polisaharid

- Tripansko modrilo 0,5% otopina

- Medij za smrzavanje stanica

10% DMSO (dimetil-sulfoksid, SIGMA)

20% FCS (GIPCO)

70% RPMI (medij za kulture, GIPCO)

- PBS (fosfatonim puferom puferirana fiziološka otopina, pH 7,2-7,4)

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

6,5 mM Na_2HPO_4 x $2H_2O$

1,5 mM KH_2PO_4

0,7 mM $CaCl_2$

0,7 mM $MgCl_2$ x $6H_2O$

- Monoklonska protutijela protiv humanih biljega (Becton Dickinson, San Jose, USA):

anti-CD3-FITC (fluorescein izotiocijanat)

anti-CD4-PE (fikoeritrin)

anti-CD8-PE

anti-CD5-FITC

anti-CD19-PE

anti-CD16-PE

anti-CD56-PE

anti-CD25-PE

- Pufer za uzorke (filtriran kroz 0,22 μm filter)

1 litra PBS

1 g glukoze

1 mM EDTA

- hladni 70% etilni alkohol (+4^{o}C)

- otopina propidijskog jodida (50 μg/ml)

- FACS pufer

PBS

1% fetalnog telećeg seruma (FCS)

0,1 % NaN_3

- 48-rupične ploče za kulturu tkiva (Zellkultur Testplatte TPP, Švicarska)

- Kompletni medij RPMI 1640:

2 mM L-glutamina

5 x 10^{-5}M 2-merkaptoetanola

10 mM Hepes pH 7,2

1 x 10^5 U/L penicilina

0,1 g/L streptomicin sulfat

10% fetalnog telećeg seruma ili

10% seruma novorođenog teleta

3.2.4.2. Izdvajanje stanica periferne krvi

Uzorak od 7 ml krvi uzet je u epruvetu s antikoagulansom (heparin) i pohranjen do odvajanja limfocita na temperaturi od 4-8 ^oC. Za dio *in vitro* pokusa stanice periferne krvi izdvojene su metodom sedimentacije na gradijentu gustoće fikola. Cijeli postupak pripreme stanica odvijao se u sterilnim uvjetima, na ledu.

Perifernu krv smo pomiješali sa 7 ml sterilne fiziološke otopine (0,9% natrijev klorid) te nadslojili nad 10 ml fikola, kojeg smo prethodno ulili u epruvetu od 50 ml. Nakon toga smo uzorak centrifugirali na stolnoj centrifugi tijekom 20 minuta na 2000 okretaja u minuti (rpm, prema engl. rotations per minute). Tijekom centrifugiranja kroz fikol prođu eritrociti i granulociti, a limfociti i monociti zaostaju na gradijentu fikola. Pasteurovom pipetom pažljivo smo pokupili magličasti prsten koji se stvorio između fikola i plazme, a dobiveni uzorak smo dva puta isprali s 10 ml fiziološke otopine, centrifugiranjem 5 minuta na 1500 rpm. Broj i vijabilnost stanica određivali smo brojanjem pod mikroskopom u Neubauerovoj komorici u 0,5%-tnoj otopini tripanskog modrila. Nad talog stanica dodali smo 2 ml medija za smrzavanje, stanice smo dobro resuspendirali i po 1 ml suspenzije ulili u dvije epruvete za smrzavanje

stanica. Stanice smo smrzavali postupno, tako da smo epruvete za smrzavanje umotali u staničevinu i stavili 30 minuta na +4 ^{o}C, 2 sata na -20 ^{o}C, te potom pohranili do analize na -80 ^{o}C.

3.2.4.3. Protokol analize

Za analizu staničnog diobenog ciklusa limfocita periferne krvi, bolesnicima se uzimao uzorak krvi iz kubitalne vene prije i nakon primjene daklizumaba prema protokolu prikazanom na slici 6, a ispitanicima iz kontrolnih skupina jednokratno. Ukoliko iz tehničkih razloga nije bilo moguće uzeti uzorke krvi u navedenim terminima, uzimani su u najbližem mogućem terminu. U dane uzimanja uzoraka krvi učinjene su rutinske laboratorijske pretrage, uključujući diferencijalni leukogram. Svi bolesnici liječeni su standardnim imunosupresivnim protkolom koji je obuhvaćao mikofenolat mofetil, prednizolon i inhibitor kalcineurina. Pored toga, bolesnici su primali daklizumab prema protokolu prikazanom na slici 6.

Slika 6: Protokol analize (strelice označavaju dane uzimanja uzoraka krvi i dane primjene daklizumaba

3.2.4.4. Protočna citometrija

Protočna citometrija je tehnologija koja omogućava istovremeno određivanje nekoliko različitih biofizičkih i biokemijskih karakteristika stanica ili drugih čestica, dok iz suspenzije pojedinačno prolaze kroz lasersku svjetlost. Suvremeni protočni citometar sastoji se od izvora svjetlosti, sabirne optike, sistema fluida (zrak, protočna otopina, uzorak), elektroničkih dijelova te računala za primanje i obradu podataka. Većina protočnih citometara kao izvor svjetlosti koristi laser, koji emitira koherentnu svjetlost određene valne duljine. Nakon ulaska stanice u lasersku zraku dio svjetlosti

se lomi i odbija od staničnih struktura, dok fluorescentna boja, potaknuta svjetlosnom energijom lasera, emitira vlastitu svjetlost neke druge valne duljine. Dio svjetlosti koji se postranično raspršı sa stanice korelira sa staničnom granuliranošću, odnosno unutrašnjom složenosti stanice, dok dio koji se raspršı u smjeru laserske zrake odgovara veličini stanice. Emisijski spektar fluorescentnih boja određuje se na fotopojačivačkim tubama koje proizvode električni signal srazmjeran količini detektirane svjetlosti. Ovi signali se elektronički prerađuju, te analiziraju namjenskim računalnim programima.

U našim radovima koristili smo se FACSCalibur protočnim citometrom (Becton Dickinson, San Jose, USA), koji omogućava istovremeno praćenje šest različitih staničnih parametara: veličinu, granuliranost (gustoću, unutrašnju složenost stanica) te valnu duljinu i intenzitet četiri različita spektra fluorescentnih boja. Analizirali smo po 1-2 x 10^4 stanica u svakom uzorku.

Slika 7: FACSCalibur protočni citometar na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

3.2.4.4.1. Određivanje fenotipske pripadnosti stanica

Određivanje imunofenotipa, odnosno specifično prikazivanje antigena na različitim tkivima i staničnim suspenzijama pomoću protutijela, našlo je široku primjenu u različitim tehnikama stanične i molekulske biologije te kliničkim dijagnostičkim testovima. Tijekom naših pokusa fenotipska zastupljenost stanica određivana je tehnikom protočne citometrije. Početak upotrebe protutijela, kao osjetljive i specifične tehnike označavanja i prikazivanja (vizualizacije) staničnih površinskih antigena, otvorio je mogućnost da se pojam fenotipa stanice, koji je

obuhvaćao uglavnom morfologiju i građu, proširi i na molekulsku, subcelularnu razinu, odnosno da se karakterizira i setom antigena zastupljenim u stanici, koji je vrlo često vezan za njenu funkciju, a koji danas nazivamo imunofenotipom.

Pored seroloških, radiografskih te imunohistoloških metoda za određivanje imunofenotipa, svakako je među najraširenijima tehnika imunofluorescencije. Ona zbog svoje jednostavnosti, relativno brze pripreme i osobito ubrzanog razvoja tehnologije monoklonskih protutijela i protočne citometrije, stječe sve veće značenje. Tijekom naših pokusa koristili smo tehniku direktne imunofluorescencije.

3.2.4.4.2. Direktna imunofluorescencija

Tehnika imunofluorescencije zasniva se na tehnologiji konjugacije protutijela fluorescentnim bojama, čime se specifičnost epitopskog vezanja za antigen postiže protutijelom, dok fluorescentna boja, potaknuta ultraljubičastom ili laserskom svjetlošću određene valne duljine, emitira vlastitu svjetlost kojom se antigen vizualizira. Imunofenotipizacija tehnikom direktne imunofluorescencije podrazumijeva obilježavanje staničnih biljega monoklonskim protutijelima, koja su izravno vezana s fluorescentnom bojom. Milijun stanica resuspendirali smo u 50μl FACS pufera, te smo suspenziji dodali 1-2 μg monoklonskih protutijela otopljenih u istom volumenu. Nakon inkubacije od 30 minuta na +4^{o}C i odstranjenja viška nevezanih protutijela ispiranjem u FACS puferu, stanice smo konačno resuspendirali u 1ml FACS pufera.

3.2.4.5. Određivanje staničnog ciklusa

Tijekom mitotičke diobe, stanice prolaze niz fiziološki definiranih faza, koje konačno rezultiraju stvaranjem dviju novih stanica kćeri od jedne majčinske stanice, u

procesu kojeg nazivamo stanični diobeni ciklus. Neoplođene reproduktivne stanice, kao što su jajašce ili spermij, nazivaju se haploidnim stanicama jer sadrže set nesparenih kromosoma (N), za razliku od diploidnih, somatskih stanica koje posjeduju set sparenih kromosoma (2N). Stanice koje se ne množe, nalaze se u mirujućoj G_0 fazi, dok proliferirajuće stanice, ovisno o fazi mitoze, variraju po sadržaju DNK - od diploidnog 2N, pa sve do tetraploidnog broja kromosoma 4N, koji se nađe u stanici neposredno pred podjelu. Diobeni ciklus stanice započinje s G_1 fazom, tijekom koje se stanice pripremaju za replikaciju DNK. Ulaskom u S fazu stanice započinju s udvostručenjem DNK, te se tijekom ove faze količina nuklearne DNK uvećava od razine G_1 faze do potpunog udvostručenja u G_2 fazi, koja predstavlja razdoblje od završetka sinteze DNK do početka diobe u dvije nove stanice kćeri, što nazivamo fazom mitoze ili M fazom.

Tijekom naših pokusa stanični ciklus određivan je metodom ugradnje propidijskog jodida u DNK. Propidijski jodid je crvena fluorescentna boja koja se umeće između lanaca dvostruko uzvijenih nukleinskih kiselina. Budući da je količina ugrađenog propidijskog jodida proporcionalna količini DNK u staničnoj jezgri, moguće je razlučiti faze diobenog ciklusa. Međutim, kako je sadržaj jezgrine DNK u nekim diobenim fazama jednak, ove je faze na osnovi količine ugrađene fluorescentne boje nemoguće razlučiti. Stoga smo u našim pokusima prikazivali postotak stanica u G_0/G_1 fazi, u kojima postoji jednaka količina jezgrine DNK (2N broj kromosoma), zatim u G_2+M fazi s tetraploidnim brojem kromosoma te postotak stanica u S fazi, u kojima količina DNK varira ovisno o stupnju replikacijskog ciklusa, u kojem se stanica nalazi.

Navedena postotna zastupljenost stanica u pojedinoj fazi diobenog ciklusa određivana je složenim matematičkim modelom, u kojem se najprije raspored stanica

u G_0/G_1 te u G_2+M fazama idealizira prema Gaussovoj krivulji (kako se stanice u ovim fazama i raspoređuju), a zatim se, na osnovi ovih parametara, računa postotak stanica u S fazi.

3.2.4.5.1. Priprema uzoraka za određivanje staničnog ciklusa

Priprema uzoraka za određivanje diobenog ciklusa započela je ispiranjem stanica u puferu za uzorke, nakon čega su bile resuspendirane u pojedinačnim uzorcima u koncentraciji od 1 x 10^6/ml, pri čemu je bilo važno da svaki uzorak sadrži jednak broj stanica. Stanice su istaložene centrifugiranjem na 400 g tijekom 10 minuta te fiksirane postupnim dodavanjem 70%-tnog etanola (-20^{o}C), uz neprekidno mućkanje na vorteksu. Fiksacija u hladnom etanolu trajala je najmanje 20 sati na -20^{o}C, nakon čega su stanice istaložene i resuspendirane u puferu za uzorke, koji je sadržavao 50 μg/ml propidijskog jodida.

Nakon polusatne inkubacije na sobnoj temperaturi, tijekom koje se propidijski jodid vezao za DNK, stanice su analizirane protočnim citometrom, koji razvrstava stanice prema intenzitetu emisijskog spektra propidijskog jodida, a koji je srazmjeran sadržaju fluorescentne boje u jezgri, a time i količini DNK. Rezultati predstavljaju postotak stanica u G_0/G_1, S i G_2+M fazi staničnog ciklusa, a dobiveni su analizom namjenskim kompjutorskim programom (CellQuest Software, Becton-Dickinson, San Jose, USA).

3.2.4.5.2. Određivanje proliferativnog odgovora limfocita

Odvojeni limfociti stimulirani su s 2,5 μg/ml anti-CD3 protutijelima u prisustvu različitih koncentracija daklizumaba, odnosno bez daklizumaba. Pokusi su izvođeni na 48-rupičnim pločama za kulturu tkiva, tako da je u 0,5 ml medija RPMI

1640 preinkubirano anti-CD3 protutijelo (OKT3) 24 sata prije kultivacije limfocita. Ovaj korak je nužan jer osigurava povezivanje i fiksaciju protutijela preko Fc receptora na plastiku ploče.

Dodatkom limfocita dolazi do povezivanja tako fiksiranih protutijela na CD3 molekule (ζ podjedinice) limfocita T, što izaziva transmembranski prijenos signala i stimulaciju stanice koja oponaša normalnu stimulaciju preko T-staničnog receptora, čime se dobije poliklonski odgovor limfocita T. Kao posljedica aktivacije uslijedi lučenje IL-2 i izražaj visokoafinitetnog IL-2R na membrani stimuliranih limfocita. Na ovo samopodražavanje ili uzajamno podražavanje, stanice reagiraju proliferacijom. Drugim riječima, lučenje IL-2 i izražaj IL-2R su ključni čimbenici odgovorni za množenje stanica. Proliferacija limfocita trajala je tri dana i odvijala se u hranjivom mediju RPMI 1640 uz dodatak 10% FCS, u inkubatoru na 37^{o}C i 5% CO_2 u zraku. Stanične kulture limfocita testirali smo u sljedećim uvjetima, što nam je i bio temeljni protokol analize:

- spontana proliferacija limfocita (kontrolna proliferacija)
- spontana proliferacija u prisustvu daklizumaba u koncentraciji od 1 μg/ml
- inducirana proliferacija s anti-CD3 monoklonskim protutijelom Orthoclone OKT3® (Ortho Biotech, Neuss, Njemačka) u koncentraciji od 2,5 μg/mlanti-CD3 inducirana proliferacija u prisustvu anti-CD25 monoklonskog protutijela daklizumaba u različitim koncentracijama: 0,1 μg/ml, 1 μg/ml i 10 μg/ml

Nakon isteka inkubacije stanice smo pokupili, dva puta isprali u puferu za uzorke te ih fiksirali u ledenohladnom (-20 ^{o}C) 70%-tnom etilnom alkoholu. Fiksacija se mora odvijati postupno uz neprekidno miješanje stanica da bi se izbjeglo agregiranje jezgara. Stanice su nakon fiksacije ostavljene u 70%-tnom etilnom

alkoholu 24 sata na -20^{o}C. Potom su stanice dva puta isprane u mediju za uzorke te obojane fluorescentnom bojom propidijskim jodidom u koncentraciji od 50 μg/ml u volumenu od 1 ml i koncentraciji od 1 x 10^{6} stanica/ml. Stanice su inkubirane na +4^{o}C iduća dva sata, nakon čega je određivana postotna zastupljenost stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa na protočnom citometru (slika 8). Svaki postupak iz protokola analize proveden je u duplikatu.

Slika 8: Određivanje zastupljenosti stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa bojanjem s propidijskim jodidom

3.2.4.5.3. Određivanje postotne zastupljenosti CD25 biljega na limfocitima periferne krvi

U istim ispitivanim skupinama je nakon primjene daklizumaba određena postotna zastupljenost aktiviranih limfocitnih podvrsta periferne krvi koje nose CD25 biljeg. Da bi pokazali zastupljenost CD25 biljega na staničnim limfocitnim populacijama periferne krvi u bolesnika pod terapijom daklizumabom, u svakom uzorku je obojeno 1 x 10^{6} stanica s 0,5 μg/ml fluorokromom obilježenog protutijela na CD3, CD4, CD8 i CD56 molekulu, uz istovremeno obilježavanje CD25 molekule protutijelom konjugiranim s nekim drugim fluorokromom, metodom direktne imunofluorescencije. Protutijela su proizvedena od tvrtke Becton Dickinson (San Jose, USA), a postotna zastupljenost limfocita periferne krvi u pojedinim fazama staničnog diobenog ciklusa očitana je na protočnom citometru, koristeći namjenski računalni program CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, USA).

3.2.5. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu korišteni su suvremeni statistički programi: Microsoft Excel, Statistica, Graph Pad Prism. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost uz

naznačenu standardnu devijaciju. Razlike srednjih vrijednosti između pokusnih skupina s vjerojatnošću pogreške manjom od 0,05 ($p<0,05$), smatrane su statistički značajnim. Razlike između pojedinih ispitivanih skupina analizirane su Studentovim t-testom i hi-kvadrat testom. U analizi preživljavanja presatka i bolesnika korištena je metoda po Kaplan-Meieru. Nivo značajnosti određen je logaritamskim testom rangova.

Za prikazivanje rezultata korišteni su programi Microsoft Power Point i Word.

4. REZULTATI

4.1. Retrospektivna analiza

Retrospektivna analiza obuhvaća presađivanja bubrega u našoj ustanovi od 1. siječnja 1985. g. do 30. lipnja 2009. g. U gotovo 25-godišnjem razdoblju učinjeno je 588 presađivanja bubrega, od toga u 5 bolesnika kombinirano presađivanje bubrega i gušterače.

4.1.1. Podatci o primateljima i darivateljima bubrežnog presatka

Tijekom razdoblja od 1. siječnja 1985. g. do 30. lipnja 2009. g. bilježi se postupno smanjenje broja presađivanja bubrega, kao i smanjenje udjela živih darivatelja (slika 9). Bubrežni presadak bio je u 423 (71,9%) primatelja od umrle osobe, u 164 (27,9%) od živog srodnog darivatelja, a jedan presadak darovala je supruga (slike 10, 11). Živi darivatelji bili su u 139 (84,2%) slučajeva jedan od roditelja, u 21 (12,7%) slučaja sestra ili brat, u dva slučaja teta, jednom ujak i jednom djed (slika 11). Od sveukupno 588 bolesnika, 545 (92,7%) podvrgnuto je postupku prvog presađivanja, 42 (7,1%) drugom, a jedan (0,2%) bolesnik trećem presađivanju bubrega (slika 12).

Slika 9: Broj učinjenih presađivanja bubrega prema vrsti darivatelja bubrega od 1. siječnja 1985. g. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka

Slika 10: Odnos umrlih i živih darivatelja bubrega od 1. siječnja 1985. g. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka

Slika 11: Živi darivatelji bubrega od 1. siječnja 1985. g. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka

Slika 12: Bolesnici s prvim, drugim i trećim postupkom presađivanja bubrega od 1. siječnja 1985. g. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka

Na slikama 13-16 prikazani su osnovni demografski podatci primatelja bubrežnog presatka. Približno dvije trećine primatelja (65,1%) bilo je muškog spola. Omjer ženskih prema muškim bolesnicima značajno je manji u posljednjem razdoblju praćenja od 1. siječnja 2005. do 30. lipnja 2009. g. u odnosu na prvo razdoblje od 1. siječnja 1985. do 31. prosinca 1989. g. ($p<0,05$). U razdoblju od 1. siječnja 1995. do 30. lipnja 2009. g. bilježi se, u odnosu na prethodno desetogodišnje razdoblje, značajan porast broja bolesnika starijih od 40 g. ($p<0,001$). Prati se i postupni porast prosječne dobi bolesnika, u muških od 37,0 ±12,2 g. u prvom petogodišnjem razdoblju od 1985. do 1999. g., na 46,7 ±13,4 g. u razdoblju od 1. siječnja 2005. do 30. lipnja 2009. g. Porast dobi ženskih bolesnika bio je u istim razdobljima od 39,4 ±12,6 na 45,6 ±13,6 g.

Osnovne bubrežne bolesti koje su dovele do završnog bubrežnog zatajenja i potrebe za nadomjesnim liječenjem dijalizom ili presađivanjem bubrega prikazuje slika 17. U razdoblju od 1. siječnja 1995. do 30. lipnja 2009. g. bilježi se, u odnosu na prethodno desetogodišnje razdoblje, značajno smanjenje učestalosti kroničnog glomerulonefritisa ($p<0,05$).

Slika 13: Raspodjela primatelja bubrega prema spolu u razdoblju od 1. siječnja 1985. g. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka

Slika 14: Broj učinjenih presađivanja bubrega prema spolu primatelja u petogodišnjim razdobljima od 1. siječnja 1985. g. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka (u

posljednjem ispitivanom razdoblju zabilježili smo statistički značajno manji omjer ženskih prema muškim bolesnicima u odnosu na prvo petogodišnje razdoblje, $p<0,05$)

Slika 15: Raspodjela bolesnika prema dobnim razredima u razdoblju od 1. siječnja 1985. do 31. prosinca 1994. g. i u razdoblju od 1. siječnja 1995. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka

Slika 16: Prosječna dob primatelja bubrežnog presatka prema petogodišnjim razdobljima od 1. siječnja 1985. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka

Slika 17: Osnovna bubrežna bolest u primatelja bubrežnog presatka u razdoblju od 1. siječnja 1985. do 31. prosinca 1994.g., i u razdoblju od 1. siječnja 1995. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka (Kratice: GN = glomerulonefritis, PN/IN = pijelonefritis/intersticijski nefritis, PC = policistična bolest, HT/NS = hipertenzija/nefroskleroza, DN = dijabetička nefropatija, SLE = sustavni lupus eritematodes, EN = endemska nefropatija, AL = Alportov sindrom, NP = nepoznato, OS = ostalo)

Tijekom 25-godišnjeg razdoblja praćenja, darivatelji organa bili su u 343 (68,4%) slučajeva muškog spola. Omjer ženskih prema muškim darivateljima značajno se smanjio u posljednjem razdoblju praćenja od 1. siječnja 2005. do 30. lipnja 2009. g., u odnosu na prvo razdoblje od 1. siječnja 1985. do 31. prosinca 1989. g. ($p<0,05$) (slika 18). Analizirajući cjelokupno razdoblje praćenja, prosječna dob muških darivatelja bila je 42,0 ±15,8 g., a ženskih darivatelja organa 49,6 ±14,5 g., i

nije se značajno promijenila. U pojedinim petogodišnjim razdobljima prosječna dob muških darivatelja bila je stalno niža (slika 19).

Slika 18: Broj učinjenih presađivanja prema spolu darivatelja u petogodišnjim razdobljima od 1. siječnja 1985. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka (u posljednjem ispitivanom razdoblju zabilježili smo statistički značajno manji omjer ženskih prema muškim darivateljima u odnosu na prvo petogodišnje razdoblje, $p<0,05$)

Slika 19: Prosječna dob darivatelja bubrežnog presatka prema petogodišnjim razdobljima od 1. siječnja 1985. do 30. lipnja 2009. g. u KBC-u Rijeka

4.1.2. Kumulativno preživljavanje primatelja i presatka

Na slikama 20 i 21 prikazano je kumulativno preživljavanje bolesnika i presadaka, izračunato po metodi Kaplan-Meier. U bolesnika koji su primili bubrežni presadak od 1996. g. do 2007. g. bilježi se značajno poboljšanje preživljavanja presatka i bolesnika u odnosu na prethodna dva razdoblja. U našem centru, kod presađivanja bubrega u razdoblju od 2001. do 2007. g., kumulativno jednogodišnje preživljavanje bolesnika iznosi 95,5 ±1,8%, presatka 89 ±2,7%, dok je petogodišnje preživljavanje bolesnika 88,3 ±3,4% i presatka 75,4 ±4,4%. U rezultatima se vidi negativan učinak ratnog razdoblja na preživljavanje bolesnika i presatka.

A Kumulativno preživljavanje bolesnika prema godišnjim razdobljima presađivanja

B

Razdoblje	Procjena preživljavanja bolesnika po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju …									
	1. godine		2. godine		3. godine		4. godine		5. godine	
2001-2007	95,5	±1,8	92,9	±2,3	92,9	±2,3	92,9	±2,3	88,3	±3,4
1996-2000	91,8	±3,0	89,4	±3,3	88,1	±3,5	85,6	±3,8	84,4	±4,0
1991-1995	86,3	±3,0	84,6	±3,2	81,9	±3,4	79,1	±3,7	73,3	±4,1
1985-1990	90,3	±2,1	87,2	±2,3	85,1	±2,5	81,0	±2,8	77,7	±3,1

C

Razdoblje		Uparene p vrijednosti logaritamskog testa rangova			
Legenda	**Br.**	**1**	**2**	**3**	**4**
2001-2007	**1**	-	0,3345	0,0035	0,0193
1996-2000	**2**	0,3345	-	0,0689	0,2361
1991-1995	**3**	0,0035	0,0689	-	0,3637
1985-1990	**4**	0,0193	0,2361	0,3637	-

D

Razdoblje	Tx	Broj na kraju…….				
		1. godine	2. godine	3. godine	4. godine	5. godine
2001-2007	137	123	107	89	72	54
1996-2000	86	77	74	71	68	67
1991-1995	133	109	98	91	84	77
1985-1990	206	185	170	159	139	118

Slika 20: **A.** Kumulativno preživljavanje bolesnika s bubrežnim presatkom u KBC-u Rijeka prema navedenim godišnjim razdobljima presađivanja; **B.** Procjena kumulativnog preživljavanja bolesnika s bubrežnim presatkom prema godišnjim razdobljima presađivanja utvrđena po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod kumulativnog preživljavanja bolesnika utvrđene testom logaritamskih rangova; **D.** Broj bolesnika s funkcionirajućim presatkom (Tx) utvrđen na kraju prve do pete godine od presađivanja bubrega

A Kumulativno preživljavanje presadaka prema godišnjim razdobljima

B

Razdoblje	Procjena preživljavanja presatka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju…									
	1. godine		2. godine		3. godine		4. godine		5. godine	
2001-2007	89,0	±2,7	82,9	±3,4	82,9	±3,4	81,6	±3,5	75,4	±4,4
1996-2000	84,7	±3,9	81,2	±4,2	77,5	±4,6	76,2	±4,7	73,7	±4,8
1991-1995	78,8	±3,6	71,9	±4,0	66,4	±4,3	62,6	±4,4	59,7	±4,5
1985-1990	81,6	±2,7	72,4	±3,1	67,2	±3,3	59,8	±3,5	57,2	±3,6

C

Razdoblje		Uparene p vrijednosti logaritamskog testa rangova			
Legenda	**Br.**	**1**	**2**	**3**	**4**
2001-2007	**1**	-	0,6751	0,0064	0,0018
1996-2000	**2**	0,6751	-	0,0399	0,0162
1991-1995	**3**	0,0064	0,0399	-	0,8567
1985-1990	**4**	0,0018	0,0162	0,8567	-

D

Razdoblje	Tx	Broj na kraju…….				
		1. godine	2. godine	3. godine	4. godine	5. godine
2001-2007	137	115	95	80	64	49
1996-2000	86	71	68	63	61	59
1991-1995	133	99	83	73	66	62
1985-1990	206	168	142	129	105	89

Slika 21: **A.** Kumulativno preživljavanje bubrežnih presadaka u KBC-u Rijeka prema navedenim godišnjim razdobljima presađivanja bubrega; **B.** Procjena kumulativnog preživljavanja bubrežnih presadaka prema godišnjim razdobljima presađivanja utvrđena po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod kumulativnog preživljavanja presadaka utvrđene testom logaritamskih rangova; **D.** Broj funkcionirajućih presadaka (Tx) utvrđen na kraju prve do pete godine od presađivanja bubrega

4.1.3. Uzroci smrti u primatelja bubrežnog presatka

Od sveukupno 588 bolesnika, kojima je u proteklom gotovo 25-godišnjem razdoblju presađen bubreg u našem centru, praćenje je prekinuto u 67 bolesnika, dijelom zbog osamostaljenja RH i gubitka kontakta s bolesnicima iz zemalja bivše države. Smrtni ishod zabilježen je kod 154 bolesnika. U 64 (41,6%) slučajeva, uzrok

smrti bile su srčanožilne bolesti, u 31 (20,1%) infekcije, u 13 (8,4%) zloćudni tumori, u 4 (2,6%) bolesnika plućna tromboembolija, u 6 (3,9%) zatajenje jetre i u 3 (1,9%) bolest pluća. Četiri (2,6%) bolesnika umrla su zbog komplikacija neposrednog kirurškog zahvata, jedan (0,6%) bolesnik je umro zbog krvarenja iz rupturirane aneurizme na arteriovenskoj fistuli, jedan (0,6 %) bolesnik je umro zbog politraume, a u 27 (17,5%) bolesnika nije poznat uzrok smrti (slika 22).

Slika 22: Uzroci smrti u primatelja bubrežnog presatka u KBC-u Rijeka od 1. siječnja 1985. do 30. lipnja 2009. g.

4.1.3.1. Maligni tumori

U 39 (6,6 %) bolesnika iste skupine postavljena je dijagnoza zloćudnog tumora. I ovdje se radi o nepotpunom prijavljivanju podataka. Zloćudni tumori ustanovljeni su prosječno 69 mj. (raspon 5-253 mj.) nakon presađivanja bubrega. U 23 (58,9%) od sveukupno 39 bolesnika, dijagnoza je postavljena u prvih pet godina nakon presađivanja, u 11 (28,2%) u razdoblju od 5 do 10 g., a u 5 (12,8%) bolesnika više od 10 g. nakon presađivanja bubrega. Bilježene su sljedeće zloćudne bolesti: 9 karcinoma kože (5 karcinoma pločastih stanica i 4 bazalioma), 5 karcinoma bubrega i uretera, 4 karcinoma prostate, 4 karcinoma dojke, 3 karcinoma mokraćnog mjehura, 3 karcinoma štitnjače, po dva karcinoma debelog crijeva, Kaposijeva sarkoma i melanoma, po jedan karcinom pluća i parotidne žlijezde, te po jedan tumor mozga i medijastinuma, a u jedne bolesnice sindrom mijelodislazije (slika 23). Porast kumulativne incidencije malignih tumora uočen je u primatelja starijih od 60 g., nakon presađivanja bubrega od umrle osobe u KBC-u Rijeka od 1985.-2007. g. (slika 24).

Osobito u bolesnika s endemskom nefropatijom nakon presađivanja bubrega postoji veliki rizik za razvoj karcinoma urotela, koji često uzrokuje smrtni ishod. U proteklom 25-godišnjem razdoblju, u našem centru je šest bolesnika s endemskom nefropatijom primilo bubreg od umrle osobe. U tri bolesnika razvio se nakon presađivanja bubrega karcinom urotela, koji je u dva bolesnika uzrokovao smrt. U trećeg bolesnika bilježeni su, unatoč jakom smanjenju razine primijenjene imunosupresije, stalni recidivi karcinoma urotela koji su iziskivali opetovane kirurške intervencije, a u jednom navratu i djelomičnu resekciju presađenog bubrega (tablica 5) (230).

Vrsta tumora

Slika 23: Prijavljeni zloćudni tumori u primatelja bubrežnog presatka u KBC-u Rijeka od 1. siječnja 1985. do 30. lipnja 2009. g.

A Kumulativna incidencija malignih tumora

B

Dob	**Procjena kumulativne incidencije malignih tumora po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...**									
	1.g.		2.g.		3.g.		4.g.		5.g.	
<10 g.	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00
10-20 g.	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00
21-30 g.	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	5.88	±5.71	5.88	±5.71
31-40 g.	0.00	±0.00	2.13	±2.10	2.13	±2.10	2.13	±2.10	5.19	±3.64
41-50 g.	0.00	±0.00	4.39	±2.48	4.39	±2.48	4.39	±2.48	10.37	±4.07
51-60 g.	0.00	±0.00	1.78	±1.77	1.79	±1.77	1.79	±1.77	4.59	±3.26
>60 g.	0.00	±0.00	2.85	±2.82	2.86	±2.82	2.86	±2.82	18.48	±7.56

Dob	**Procjena kumulativne incidencije malignih tumora po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...**									
	6.g.		7.g.		8.g.		9.g.		10.g.	
<10 g.	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00

10-20 g.	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00
21-30 g.	5.88	±5.71	5.88	±5.71	5.88	±5.71	5.88	±5.71	5.88	±5.71
31-40 g.	8.57	±4.83	8.57	±4.83	8.57	±4.83	8.57	±4.83	15.10	±7.73
41-50 g.	10.37	±4.07	13.00	±4.73	13.00	±4.73	13.00	±4.73	13.00	±4.73
51-60 g.	8.41	±4.87	8.41	±4.87	8.41	±4.87	14.95	±7.76	14.95	±7.76
>60 g.	23.28	±8.50	23.28	±8.50	38.62	±15.32	38.62	±15.32	38.62	±15.32

C

Dob		**Uparene p vrijednosti logaritamskog testa rangova**						
Legenda	**broj**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
< 10 g.	**1**	-	.	0.8084	0.6895	0.7104	0.6912	0.4991
10-20 g.	**2**	.	-	0.6744	0.6039	0.5715	0.6087	0.3880
21-30 g.	**3**	0.8084	0.6744	-	0.6058	0.4264	0.6120	0.0874
31-40 g.	**4**	0.6895	0.6039	0.6058	-	0.7351	0.9256	0.0558
41-50 g.	**5**	0.7104	0.5715	0.4264	0.7351	-	0.6769	0.1478
51-60 g.	**6**	0.6912	0.6087	0.6120	0.9256	0.6769	-	0.0563
>60 g.	**7**	0.4991	0.3880	0.0874	0.0558	0.1478	0.0563	-

D

Dob	**Tx**	**Broj na kraju …**									
		1.g.	**2.g.**	**3.g.**	**4.g.**	**5.g.**	**6.g.**	**7.g.**	**8.g.**	**9.g.**	**10.g.**
< 10 g.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10-20g.	4	3	3	3	2	2	2	1	1	1	1
21-30g.	29	25	21	18	16	13	13	11	7	6	5
31-40g.	65	49	41	37	34	31	27	22	18	14	13
41-50g.	86	75	64	58	51	44	41	30	25	18	16
51-60g.	80	57	53	48	41	33	21	18	14	11	8
>60 g.	42	36	32	27	26	20	15	8	3	3	2

Slika 24: **A**. Kumulativna incidencija malignih tumora kod presađivanja bubrega od umrle osobe prema dobnim skupinama primatelja u KBC-u Rijeka od 1985.-2007.g.; **B.** Procjena kumulativne incidencije malignih tumora prema dobnim skupinama primatelja utvrđena po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod kumulativne incidencije malignih tumora utvrđene testom logaritamskih rangova; **D.** Broj bolesnika s funkcionirajućim presatkom (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja bubrega

Tablica 5: Ishod bolesnika s endemskom nefropatijom nakon presađivanja bubrega

Bolesnik, spol, dob kod tx*, godina tx	**Dijagnoza karcinoma urotela, interval od tx (godine)**	**Lokalizacija karcinoma urotela**	**Praćenje**
M.D., muški **29 g., 1985.g.**	-	-	Prekinuto 6,6 g. nakon tx
D.R., muški **66 g., 1986.**	11,6 g. prije tx; 7,6 g. prije tx; 7,0 g. poslije tx	Lijevi mokraćovod i nakapnica; čašice desnog bubrega; ranije reseciran desni bubreg	Smrt 7,1 g. nakon tx
S.I., muški **61 g., 1986.**	-	-	Prekinuto 6,0 g. nakon tx*
P.N., muški **36 g., 1994**	4,6 g. nakon tx	Ureter	Smrt 5,2 g. nakon tx
F.M., ženski **65 g., 1998.**	-	-	Smrt 6,9 g. nakon tx.
M.N., muški **45 g., 1998**	1,1 g. nakon tx; 2,9 g. nakon tx; 6,6 g. nakon tx	Mokraćni mjehur, nekoliko recidiva; lijevi ureter; čašice presatka	Živi sa značajno disfunkcijom presatka, 11 g. nakon tx

*Nakon navedenog razdoblja praćenje bolesnika iz zemalja bivše Jugoslavije nije bilo moguće zbog gubitka kontakta s bolesnikom. Kratica: tx = presađivanje

4.1.4. Utjecaj kliničkih i imunoloških čimbenika na preživljavanje presatka

Analizirajući podatke o presađivanju bubrega u naših primatelja u razdoblju od 1985.-2007. g., preživljavanje bubrežnog presatka od živog darivatelja nije bilo statistički značajno bolje od onog zabilježenog kod umrlih darivatelja (slika 25). Također nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju presatka kod prvog u odnosu na drugo presađivanje bubrega (slika 26). Preživljavanje bubrežnog presatka od darivatelja starijeg od 50 g. bilo je značajno lošije nego kod presatka od darivatelja između 21 i 50 g. ($p<0,001$) (slika 27). Analizirajući dob primatelja, također se bilježilo značajno lošije preživljavanje presatka u slučaju kada je primatelj bio stariji od 50 g. u odnosu na primatelje od 21 do 50 g. ($p<0,001$) (slika 28). Značajno lošije preživljavanje bilo je i u slučajevima kada su muški primatelji primili presadak od ženskog darivatelja ($p<0,001$) (slika 29).

Nepodudarnosti u HLA-A, -B i -DR antigenima nisu imale statistički značajan negativan utjecaj na preživljavanje presatka (slike 30, 31). Analizirajući presađivanje bubrega od darivatelja s identičnom i podudarnom AB0 krvnom grupom, uočeno je statistički značajno bolje preživljavanje presatka u slučaju AB0 identičnog darivatelja ($p<0,05$) (slika 32). U primatelja krvne grupe B pokazao se trend prema lošijem preživljavanju presatka, ako je darivatelj imao krvnu grupu 0 (slika 33).

Analizirajući osnovne bubrežne bolesti primatelja, najbolje preživljavanje presatka bilo je u primatelja s policističnom bolesti bubrega. Ono je bilo statistički značajno bolje u odnosu na bolesnike s hipertenzivnom bolesti bubrgega ili nefrosklerozom ($p<0,01$) te u odnosu na bolesnike s pijelo- ili intersticijskim nefritisom i dijabetičkom nefropatijom ($p<0,05$) (slika 34). Naši rezultati nisu pokazali značajan učinak dužine trajanja liječenja dijalizom te trajanja hladne ishemije, koja je u svih bolesnika iznosila manje od 37 sati, na preživljavanje presatka (slike 35, 36).

A **Preživljavanje bubrežnog presatka prema vrsti darivatelja**

B

Darivatelj	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan- Meier ± SG u % na kraju ...									
	1. g.		2. g.		3. g.		4. g.		5. g.	
Umrli	81,6	±2,0	75,2	±2,2	71,7	81,6	±2,0	75,2	±2,2	71,7
Živi	88,9	±2,5	79,8	±3,3	75,4	88,9	±2,5	79,8	±3,3	75,4

Darivatelj	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan- Meier ± SG u % na kraju ...									
	6. g.		7. g.		8. g.		9. g.		10. g.	
Umrli	58,9	±2,7	50,2	±2,9	43,9	58,9	±2,7	50,2	±2,9	43,9
Živi	65,2	±4,2	61,7	±4,7	57,8	65,2	±4,2	61,7	±4,7	57,8

C

Darivatelj		P	
	Broj	1	2
Umrli	1	-	0,1844
Živi	0	0,1844	-

D

Dari-vatelj	Broj Tx	Broj na kraju …									
		1.g.	**2.g.**	**3.g.**	**4.g.**	**5.g.**	**6.g.**	**7.g.**	**8.g.**	**9.g.**	**10.g.**
Umrli	392	312	273	242	214	194	157	116	90	71	57
Živi	165	140	114	103	82	65	52	36	29	25	19

Slika 25: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka prema vrsti darivatelja u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja presatka prema vrsti darivatelja utvrđena po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja presatka utvrđene testom logaritamskih rangova; **D.** Broj funkcionirajućih presadaka (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A **Preživljavanje bubrežnih presadaka prema postupku presađivanja**

B

	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan- Meier ± SG u % na kraju ...									
	1. g.		2. g.		3. g.		4. g.		5. g.	
1.presadak	83,3	±1,6	76,8	±1,9	73	±	68,8	±2,1	65,5	±2,2
2.presadak	82,5	±6,0	74	±7,1	70,9	±	63,4	±8,3	59,7	±8,6

	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan- Meier ± SG u % na kraju ...									
	6. g.		7. g.		8. g.		9. g.		10. g.	
1.presadak	60,9	±2,4	52,7	±2,6	46,5	±2,8	42,7	±2,8	37,3	±3,0
2.presadak	55,1	±9,1	55,1	±9,1	55,1	±9,1	55,1	±9,1	55,1	±9,1

C

Postupak		P	
	Broj	1	2
1.presadak	1	-	0,7464
2.presadak	0	0,7464	-

D

Postupak	Broj Tx	Broj na kraju …									
		1.g.	2.g.	3.g.	4.g.	5.g.	6.g.	7.g.	8.g.	9.g.	10.g.
1.presadak	517	420	361	322	279	243	197	143	112	89	69
2.presadak	40	32	26	23	17	16	12	9	7	7	7

Slika 26: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka prema prvom i drugom postupku presađivanja u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja presatka prema prvom i drugom postupku presađivanja po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja presatka; **D.** Broj funkcionirajućih presadaka (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A **Kumulativno preživljavanje presadaka prema dobi darivatelja**

B

Dob	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan- Meier ± SG u % na kraju ...									
	1. g.		2. g.		3. g.		4. g.		5. g.	
< 21 g.	81,2	±4,9	79,5	±5,1	75,9	±5,4	74,1	±5,6	70,3	±5,9
21-50 g.	85,2	±2,2	81,8	±2,5	78,6	±2,6	75,1	±2,8	70,3	±3,1
>50 g.	82,9	±2,4	70,2	±3,1	65,5	±3,2	59,3	±3,4	58,0	±3,5

Dob	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan- Meier ± SG u % na kraju ...									
	6. g.		7. g.		8. g.		9. g.		10. g.	
< 21 g.	56,7	±6,9	48,6	±7,3	48,6	±7,3	40,5	±8,0	36,0	±8,3
21-50 g.	68,4	±3,2	63,7	±3,5	57,0	±3,8	54,1	±4,0	47,6	±4,3
>50 g.	53,0	±3,6	42,0	±4,0	35,9	±4,1	32,6	±4,1	29,0	±4,2

C

		P		
Dob	Broj	1	2	3
< 21 g.	1	-	0,1957	0,2427
21-50 g.	2	0,1957	-	0,0002
>50 g.	3	0,2427	0,0002	-

D

	Broj Tx	Broj na kraju …									
		1.g.	2.g.	3.g.	4.g.	5.g.	6.g.	7.g.	8.g.	9.g.	10.g.
< 21 god	64	49	47	43	40	37	25	18	16	10	8
21-50 god	251	208	190	173	151	131	109	82	68	56	44
>50 god	241	194	149	128	104	90	74	51	35	30	24

Slika 27: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka prema dobi darivatelja u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja presatka prema dobi darivatelja po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja presatka; **D.** Broj funkcionirajućih presadaka (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A **Preživljavanje presadaka prema dobi primatelja**

B

Dob	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	1. g.		2. g.		3. g.		4. g.		5. g.	
< 21 g.	95,7	±4,3	86,5	±7,2	76,9	±9,1	71,8	±9,8	66,3	±10,5
21-50 g.	85,9	±1,8	78,0	±2,2	74,1	±2,3	69,0	±2,5	66,7	±2,6
>50 g.	76,1	±3,5	71,0	±3,8	68,7	±3,9	66,1	±4,0	60,8	±4,2

Dob	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	6. g.		7. g.		8. g.		9. g.		10. g.	
< 21 g.	66,3	±10,5	51,5	±12,3	51,5	±12,5	44,2	±12,5	36,8	±12,4
21-50 g.	65,0	±2,7	59,3	±3,2	52,9	±3,3	49,5	±3,3	45,7	±3,5
>50 g.	48,0	±4,7	36,9	±4,9	31,0	±4,9	27,9	±4,9	20,5	±4,8

C

		p		
Dob	Broj	1	2	3
< 21 g.	1	-	0,8434	0,1326
21-50 g.	2	0,8438	-	0,0001
>50 g.	3	0,1326	0,0001	-

D

	Broj Tx	Broj na kraju …									
		1.g.	2.g.	3.g.	4.g.	5.g.	6.g.	7.g.	8.g.	9.g.	10.g.
< 21 god	23	22	19	16	14	12	10	7	7	6	5
21-50 god	385	319	269	241	241	179	154	115	91	72	60
>50 god	147	109	98	87	87	68	45	30	21	18	11

Slika 28: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka prema dobi primatelja u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja presatka prema dobi primatelja po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja presatka; **D.** Broj funkcionirajućih presadaka (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A Preživljavanje presadaka prema spolu darivatelja i primatelja

B

	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	1. g.		**2. g.**		**3. g.**		**4. g.**		**5. g.**	
P=Ž D=M	79,6	±4,2	78,4	±4,3	77,2	±4,4	77,2	±4,4	73,3	±4,7
P=M D=M	84	±3,0	76,1	±6,5	70,8	±3,8	68,4	±3,9	65,2	±4,1
P=Ž D=Ž	85	±5,2	73,8	±6,5	73,8	±6,5	68,5	±7,0	65,4	±7,4
P=M D=Ž	75,2	±5,1	67,5	±5,6	62,2	±5,9	52,2	±6,4	46,4	±6,6
	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	6. g.		**7. g.**		**8. g.**		**9. g.**		**10. g.**	
P=Ž D=M	68,5	±5,1	56,2	±6,0	52,2	±6,2	49,6	±6,4	43,7	±6,8
P=M D=M	59,5	±4,3	53	±4,6	45,9	±4,8	43,2	±4,9	38,2	±5,1
P=Ž D=Ž	62,3	±7,7	62,3	±7,7	52,7	±9,0	46,8	±9,7	46,8	±9,7
P=M D=Ž	40,1	±6,9	23,6	±6,2	19,5	±5,5	13,8	±5,2	13,8	±5,2

C

		p			
	Broj	1	2	3	4
P=Ž D=M	1	-	0,4099	0,9904	0,0002
P=M D=M	2	0,4099	-	0,5231	0,0007
P=Ž D=Ž	3	0,9904	0,5231	-	0,0030
P=M D=Ž	4	0,0002	0,0007	0,0030	-

D

	Broj Tx	**Broj na kraju …**									
		1.g.	**2.g.**	**3.g.**	**4.g.**	**5.g.**	**6.g.**	**7.g.**	**8.g.**	**9.g.**	**10.g.**
P=Ž D=M	93	72	69	63	60	56	43	32	26	19	15
P=M D=M	150	124	106	86	86	80	63	50	39	32	23
P=Ž D=Ž	47	39	33	26	26	21	20	15	11	8	8
P=M D=Ž	73	53	44	27	27	23	19	10	7	5	4

Slika 29: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka kod prvog postupka presađivanja od umrle osobe prema spolu darivatelja i primatelja u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja presatka prema spolu darivatelja i primatelja po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod

preživljavanja presatka; **D.** Broj funkcionirajućih presadaka (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A Preživljavanje presadaka prema nepodudarnostima u HLA-A+B+DR lokusu

B

Nepodudarnost	**Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju …**									
	1. g.		**2. g.**		**3. g.**		**4. g.**		**5. g.**	
0-2	83,5	±2,3	78,5	±2,5	75,5	±2,7	70,2	±2,9	68,2	±3,0
3-6	85,3	±2,2	75,5	±2,8	71,3	±2,9	67,2	±3,1	62	±3,3
Nepodudarnost	**Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju …**									
	6. g.		**7. g.**		**8. g.**		**9. g.**		**10. g.**	
0-2	62,7	±3,3	54	±3,7	50	±3,8	46,7	±3,9	43,1	±4,0
3-6	57,5	±3,5	50,7	±3,7	43,7	±1,0	39,1	±4,2	32,6	±4,4

C

		p	
Nepodudarnost	Broj	1	2
0-2	1	-	0,1667
3-6	2	0,1667	-

D

Nepodudarnost	**Broj Tx**	**Broj na kraju …**									
		1.g.	**2.g.**	**3.g.**	**4.g.**	**5.g.**	**6.g.**	**7.g.**	**8.g.**	**9.g.**	**10.g.**
0-2	273	224	191	173	147	133	104	74	63	53	48
3-6	255	207	176	154	131	108	88	68	50	34	25

Slika 30: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka kod prvog presađivanja bubrega od umrle osobe prema nepodudarnostima u HLA-A+B+DR lokusu u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja presatka prema nepodudarnostima u HLA-A+B+DR lokusu po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja presatka; **D.** Broj funkcionirajućih presadaka (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A Preživljavanje presadaka prema nepodudarnosti u HLA-DR lokusu

B

Nepodudarnost	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	1. g.		2. g.		3. g.		4. g.		5. g.	
0	83,7	±2,3	79,6	±2,5	75,7	±2,7	70,4	±2,9	67,5	±3,0
1	84,9	±2,3	74,9	±2,8	71,6	±2,9	67,4	±2,1	63,2	±3,3
2	100	±27,2	33,3	±27,2	33,3	±27,2	-	-	-	-
Nepodudarnost	**Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...**									
	6. g.		7. g.		8. g.		9. g.		10. g.	
0	60,5	±3,3	51,3	±3,7	46,6	±3,8	42,2	±3,9	39,3	±4,0
1	60,5	±3,4	54,1	±3,7	47,9	±4,0	44,7	±4,1	37,6	±4,4
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C

		P		
Nepodudarnost	Broj	1	2	3
0	1	-	0,7939	0,0922
1	2	0,7939	-	0,1316
2	3	0,0922	0,1316	-

D

Nepodudarnost	Broj Tx	Broj na kraju …									
		1.g.	2.g.	3.g.	4.g.	5.g.	6.g.	7.g.	8.g.	9.g.	10.g.
0	271	220	195	173	148	136	104	74	59	48	41
1	254	208	171	153	130	105	88	68	54	42	32
2	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Slika 31: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka kod prvog presađivanja bubrega od umrle osobe prema HLA-DR nepodudarnosti u KBC-u Rijeka od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja presatka prema nepodudarnostima u HLA-DR lokusu po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja presatka; **D.** Broj funkcionirajućih presadaka (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A **Preživljavanje presadaka prema AB0 podudarnosti**

B

	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	1. g.		**2. g.**		**3. g.**		**4. g.**		**5. g.**	
Identično	82,7	±2,3	76,5	±2,6	74	±2,7	70,4	±2,8	67,5	±2,9
Podudarno	75,6	±4,9	67,8	±5,3	61	±5,6	58,2	±5,7	52,4	±5,8
	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	6. g.		**7. g.**		**8. g.**		**9. g.**		**10. g.**	
Identično	63,3	±3,1	53	±3,5	45,6	±3,6	41,4	±3,7	37,7	±3,8
Podudarno	44,4	±5,9	38,1	±6,1	33,9	±3,1	33,9	±6,1	30,5	±6,4

C

		p	
	Broj	1	2
Identično	1	-	0,0324
Podudarno	2	0,0324	-

D

	Broj Tx	**Broj na kraju …**									
		1.g.	**2.g.**	**3.g.**	**4.g.**	**5.g.**	**6.g.**	**7.g.**	**8.g.**	**9.g.**	**10.g.**
Identično	284	228	199	177	157	144	117	89	67	50	41
Podudarno	78	59	52	45	41	36	28	18	16	14	9

Slika 32: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka prema AB0 podudarnosti kod prvog presađivanja bubrega od umrle osobe u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007.g.; **B.** Procjena preživljavanja presatka prema AB0 podudarnosti po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja presatka; **D.** Broj funkcionirajućih presadaka (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A Preživljavanje presadaka prema kombinacijama AB0 krvnih grupa primatelja i darivatelja

B

Krvna grupa	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju …									
	1. g.		2. g.		3. g.		4. g.		5. g.	
P=0 D=0	83.2	±4.2	79.0	±4.7	76.0	±5.0	72.9	±5.2	68.1	±5.6
P=A D=A	85.7	±3.0	78.7	±3.5	75.2	±3.8	70.5	±4.1	68.5	±4.2
P=B D=B	73.9	±6.2	69.7	±6.5	69.7	±6.5	67.3	±6.7	64.6	±7.0
P=AB D=AB	80.0	±10.3	65.5	±12.6	65.5	±12.6	65.5	±12.6	65.5	±12.6
P=A D=0	78.4	±6.8	73.0	±7.3	61.7	±8.1	58.8	±8.2	52.9	±8.4
P=B D=0	72.7	±9.5	59.1	±10.5	59.1	±10.5	54.5	±10.6	50.0	±10.7
P=AB D=0,A,B	73.7	±10.1	68.0	±10.8	61.8	±11.5	61.8	±11.5	54.1	±12.4
Krvna grupa	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju …									
	6. g.		7. g.		8. g.		9. g.		10. g.	
P=0 D=0	62.8	±5.9	50.6	±6.5	40.5	±6.9	37.6	±7.0	37.6	±7.0
P=A D=A	63.8	±4.5	54.7	±5.0	46.5	±5.3	43.1	±5.4	36.9	±5.7
P=B D=B	64.6	±7.0	50.3	±8.3	46.1	±8.6	41.9	±8.8	41.9	±8.8
P=AB D=AB	57.3	±13.4	57.3	±13.4	57.3	±13.4	38.2	±18.0	19.1	±16.2
P=A D=0	46.3	±8.5	42.1	±8.7	37.9	±8.8	37.9	±8.8	31.6	±9.3
P=B D=0	35.0	±10.4	35.0	±10.4	29.2	±10.2	29.2	±10.2	29.2	±10.2
P=AB D=0,A,B	54.1	±12.4	27.1	±14.9	27.1	±14.9	27.1	±14.9	27.1	±14.9

C

Odabir		Uparene p vrijednosti logaritamskog testa rangova						
Legenda	broj	1	2	3	4	5	6	7
P=0 D=0	1	-	0.8003	0.8370	0.8771	0.3193	0.1437	0.2421
P=A D=A	2	0.8003	-	0.6690	0.6648	0.2069	0.0745	0.1514
P=B D=B	3	0.8370	0.6690	-	0.8954	0.4825	0.2153	0.3659
P=AB D=AB	4	0.8771	0.6648	0.8954	-	0.8553	0.4695	0.5659
P=A D=0	5	0.3193	0.2069	0.4825	0.8553	-	0.5523	0.7834
P=B D=0	6	0.1437	0.0745	0.2153	0.4695	0.5523	-	0.7663
P=AB D=0,A,B	7	0.2421	0.1514	0.3659	0.5659	0.7834	0.7663	-

D

Odabir	Tx	Broj na kraju …									
		1.g.	**2.g.**	**3.g.**	**4.g.**	**5.g.**	**6.g.**	**7.g.**	**8.g.**	**9.g.**	**10.g.**
P=0 D=0	78	63	56	51	47	43	35	25	16	13	13
P=A D=A	141	117	101	86	74	69	55	43	34	25	18
P=B D=B	50	36	33	31	28	24	20	14	11	10	9
P=AB D=AB	15	12	9	9	8	8	7	7	6	2	1
P=A D=0	37	29	27	22	20	18	14	10	9	8	5
P=B D=0	22	16	13	13	12	11	7	6	5	4	3
P=AB D=0,A,B	19	14	12	10	9	7	7	2	2	2	1

Slika 33: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka prema kombinacijama AB0 krvnih grupa primatelja i darivatelja kod prvog presađivanja bubrega od umrle osobe u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja bubrežnog presatka prema kombinacijama AB0 krvnih grupa primatelja i darivatelja utvrđena po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja bubrežnog presatka prema kombinacijama AB0 krvnih grupa primatelja i darivatelja utvrđene testom logaritamskih rangova; **D.** Broj bolesnika s funkcionirajućim presatkom (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A Preživljavanje presadaka prema osnovnoj bubrežnoj bolesti primatelja

B

Odabir	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	1. g.		**2. g.**		**3. g.**		**4. g.**		**5. g.**	
Glomerulonefritis	81.4	±3.1	74.6	±3.5	70.3	±3.7	68.1	±3.8	62.6	±4.0
Pijelonefritis	78.2	±5.0	72.3	±5.4	70.7	±5.5	61.8	±6.1	56.2	±6.3
Policistična bolest	79.5	±6.5	79.5	±6.5	79.5	±6.5	79.5	±6.5	79.5	±6.5
Nefroskleroza	86.7	±6.2	71.6	±8.6	60.3	±9.4	60.3	±9.4	60.3	±9.4
Dijabetička nefropatija	68.4	±10.7	57.9	±11.3	52.6	±11.5	52.6	±11.5	46.1	±11.8

Odabir	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	6. g.		7. g.		8. g.		9. g.		10. g.	
Glomerulonefritis	58.4	±4.2	46.7	±4.5	41.5	±4.6	37.8	±4.6	36.4	±4.7
Pijelonefritis	52.5	±6.4	46.2	±6.6	41.0	±6.8	37.9	±7.0	28.4	±7.1
Policistična bolest	74.5	±7.7	74.5	±7.7	67.1	±9.9	58.7	±11.7	58.7	±11.7
Nefroskleroza	46.4	±10.1	30.9	±9.9	15.5	±8.0	15.5	±8.0	15.5	±8.0
Dijabetička nefropatija	46.1	±11.8	36.8	±12.5	36.8	±12.5	36.8	±12.5	24.6	±13.0

C

Odabir		Uparene p vrijednosti logaritamskog testa rangova				
Legenda	**Broj**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Glomerulonefritis	**1**	-	0.4863	0.0668	0.0955	0.1644
Pijelonefritis	**2**	0.4863	-	0.0245	0.2590	0.3958
Policistična bolest	**3**	0.0668	0.0245	-	0.0055	0.0198
Nefroskleroza	**4**	0.0955	0.2590	0.0055	-	0.9737
Dijabetička nefropatija	**5**	0.1644	0.3958	0.0198	0.9737	-

D

Odabir	Tx	Broj na kraju …									
		1.g.	**2.g.**	**3.g.**	**4.g.**	**5.g.**	**6.g.**	**7.g.**	**8.g.**	**9.g.**	**10.g.**
Glomerulonefritis	162	129	110	98	90	81	68	49	40	31	25
Pijelonefritis	69	53	49	44	35	30	28	22	16	12	9
Policistična bolest	39	31	30	25	25	23	15	12	9	7	7
Nefroskleroza	30	24	19	16	14	14	10	6	3	2	1
Dijabetička nefropatija	19	13	11	10	9	7	5	4	4	4	2

Slika 34: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka prema osnovnoj bubrežnoj bolesti primatelja kod prvog presađivanja bubrega od umrle osobe u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja bubrežnog presatka prema osnovnoj bubrežnoj bolesti primatelja utvrđena po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja bubrežnog presatka prema osnovnoj bubrežnoj bolesti primatelja utvrđene testom logaritamskih rangova; **D.** Broj bolesnika s funkcionirajućim presatkom (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A Preživljavanje presadaka prema trajanju liječenja dijalizom prije presađivanja

B

Odabir	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	1. g.		2. g.		3. g.		4. g.		5. g.	
bez dijalize	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
do 1 g.	82.3	±4.6	73.3	±5.4	67.2	±5.7	65.7	±5.8	62.5	±5.9
1-3 g.	83.0	±3.4	76.9	±3.8	73.0	±4.1	70.0	±4.3	64.4	±4.6
3-5 g.	78.9	±4.8	71.1	±5.5	69.5	±5.6	66.0	±5.8	64.2	±5.9
> 5 g.	78.8	±4.2	74.2	±4.6	71.6	±4.8	66.1	±5.1	61.9	±5.3

Odabir	Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ...									
	6. g.		7. g.		8. g.		9. g.		10. g.	
bez dijalize	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
do 1 g.	55.8	±6.2	44.6	±6.4	38.5	±6.4	33.4	±6.5	30.8	±6.5
1-3 g.	60.5	±4.9	54.2	±5.3	52.4	±5.4	50.5	±5.5	45.7	±6.0
3-5 g.	60.2	±6.2	53.5	±6.6	44.6	±6.8	42.0	±6.9	38.7	±7.1
> 5 g.	55.2	±5.7	42.4	±6.1	31.2	±6.2	28.1	±6.3	24.6	±6.4

C

Odabir		Uparene p vrijednosti logaritamskog testa rangova				
Legenda	broj	1	2	3	4	5
bez dijalize	1	-	-	-	-	-
do 1 g.	2	-	-	0.1835	0.5249	0.6641
1-3 g.	3	-	0.1835	-	0.4733	0.0807
3-5 g.	4	-	0.5249	0.4733	-	0.2944
> 5 g.	5	-	0.6641	0.0807	0.2944	-

D

Odabir	Tx	Broj na kraju …									
		1.g.	2.g.	3.g.	4.g.	5.g.	6.g.	7.g.	8.g.	9.g.	10.g.
bez dijalize	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
do 1 g.	68	55	49	44	42	40	33	24	19	13	12
1-3 g.	124	99	88	76	68	58	47	34	30	26	19
3-5 g.	71	56	46	43	38	35	30	24	20	16	12
> 5 g.	95	73	64	55	48	45	33	24	14	9	7

Slika 35: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka prema trajanju dijalize u primatelja kod prvog presađivanja bubrega od umrle osobe u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007. g.; **B.** Procjena preživljavanja bubrežnog presatka prema trajanju dijalize u primatelja utvrđena po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja bubrežnog presatka prema trajanju dijalize u primatelja utvrđene testom logaritamskih rangova; **D.** Broj bolesnika s funkcionirajućim presatkom (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

A **Preživljavanje presadaka prema trajanju hladne ishemije**

B

Odabir	**Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ..**									
	1. g.		**2. g.**		**3. g.**		**4. g.**		**5. g.**	
≤6 h	83.3	±8.8	76.9	±10.2	76.9	±10.2	70.5	±11.2	64.1	±11.9
7-12 h	81.8	±4.4	76.3	±4.9	72.0	±5.2	67.6	±5.5	63.1	±5.7
13-24 h	80.4	±2.8	73.4	±3.2	70.1	±3.3	67.2	±3.4	63.0	±3.5
25-36 h	78.1	±6.1	70.3	±7.0	64.7	±7.5	64.7	±7.5	64.7	±7.5
≥37 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Odabir	**Procjena preživljavanja presadaka po metodi Kaplan-Meier ± SG u % na kraju ..**									
	6. g.		**7. g.**		**8. g.**		**9. g.**		**10. g.**	
≤6 h	64.1	±11.9	56.1	±12.8	48.1	±13.2	38.5	±13.6	38.5	±13.6
7-12 h	56.3	±6.0	48.5	±6.3	44.3	±6.4	39.1	±6.6	36.3	±6.7
13-24 h	57.4	±3.7	48.5	±4.0	40.3	±4.2	39.2	±4.2	34.1	±4.3
25-36 h	64.7	±7.5	52.6	±8.8	48.2	±9.1	43.8	±9.2	43.8	±9.2
≥37 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C

Odabir		Uparene p vrijednosti logaritamskog testa rangova				
Legenda	**broj**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
≤6 h	**1**	-	0.7787	0.6813	0.9771	-
7-12 h	**2**	0.7787	-	0.8274	0.7646	-
13-24 h	**3**	0.6813	0.8274	-	0.6326	-
25-36 h	**4**	0.9771	0.7646	0.6326	-	-
≥37 h	**5**	-	-	-	-	-

D

Odabir	Tx	Broj na kraju …									
		1.g.	**2.g.**	**3.g.**	**4.g.**	**5.g.**	**6.g.**	**7.g.**	**8.g.**	**9.g.**	**10.g.**
≤6 h	18	15	12	12	11	10	9	7	6	4	3
7-12 h	77	62	56	50	46	42	33	25	21	15	13
13-24 h	199	156	138	128	116	104	82	60	44	35	27
25-36 h	46	34	27	23	19	19	18	14	11	10	7
≥37 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Slika 36: **A.** Preživljavanje bubrežnog presatka prema trajanju hladne ishemije bubrežnog presatka kod prvog presađivanja bubrega od umrle osobe u KBC-u Rijeka u razdoblju od 1985.-2007.g.; **B.** Procjena preživljavanja bubrežnog presatka prema trajanju hladne ishemije bubrežnog presatka utvrđena po metodi Kaplan-Meier; **C.** Značajnost razlika p-vrijednosti kod preživljavanja bubrežnog presatka prema trajanju hladne ishemije bubrežnog presatka utvrđene testom logaritamskih rangova; **D.** Broj bolesnika s funkcionirajućim presatkom (Tx) utvrđen na kraju prve do desete godine od presađivanja

4.2. Rezultati prospektivne analize

4.2.1. Klinički podatci o primateljima i darivateljima bubrežnog presatka

Prospektivnom analizom obuhvaćeni su primatelji bubrežnog presatka u KBC-u Rijeka od 1. prosinca 2006.g. do 1. prosinca 2008.g. Učinjeno je ukupno 36 presađivanja bubrega, 34 (94,4 %) od umrle osobe. Dvije bolesnice primile su bubrežni presadak od živog srodnog darivatelja, majke i tete (slika 37). Od sveukupno 36 bolesnika, njih 32 (88,9 %) podvrgnuto je prvi put presađivanju bubrega, a četiri (11,1%) bolesnika drugom presađivanju (slika 38).

Slika 37: Odnos umrlih i živih darivatelja bubrega od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka

Slika 38: Bolesnici s prvim i drugim postupkom presađivanja bubrega od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka

Osnovne demografske značajke bolesnika prikazane su na slikama 39 i 40. Od sveukupno 36 bolesnika, njih 23 (63,9 %) bilo je muškog spola. Prosječna dob bolesnika bila je 49,8 ± 9,61 g. (raspon 21,2 do 64,5 g.), u muškaraca 50,8 g. ±7,82 g. (raspon 34,3 do 64,5 g.), a u žena 52,0 ±13,0 g. (raspon 21,2 do 62,3 g.).

Slika 39: Raspodjela primatelja bubrežnog presatka prema spolu u razdoblju od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka

Slika 40: Dobni razredi i spol primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka

Slike 41 i 42 prikazuju raspodjelu prema spolu i učestalost osnovnih bubrežnih bolesti koje su bile uzrokom završnog stadija bubrežnog zatajenja, a koje je zahtijevalo liječenje presađivanjem bubrega. Kronični glomerulonefritis bio je osnovna bubrežna bolest u 17 (47,2%) bolesnika, intersticijski nefritis u 9 (25,0%) bolesnika, policistična bolest bubrega u četiri (11,1%) bolesnika, hipertenzivna bolest bubrega u dva (5,6%) bolesnika, u jedne (2,8%) bolesnice nefropatija nakon eklampsije s razvojem HELLP sindroma (prema engl. hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count), u jednog bolesnika (2,8%) dijabetička nefropatija (dijabetes melitus tip 2), a u dvije bolesnice (5,6%) osnovna bubrežna bolest bila je nepoznate etiologije.

Slika 41: Učestalost osnovnih bubrežnih bolesti u primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka

Slika 42: Učestalost osnovnih bubrežnih bolesti prema spolu primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka (Kratice: GN = glomerulonefritis, PN/IN = pijelonefritis / intersticijski nefritis, PC = policistična bolest, HT/NS = hipertenzija / nefroskleroza, DN = dijabetička nefropatija, NP = nepoznato)

Neposredno prije presađivanja bubrega, 33 (91,7%) bolesnika liječeno je hemodijalizom, a tri (8,3%) bolesnika peritonejskom dijalizom. U primatelja bubrega od umrle osobe, liječenje dijalizom trajalo je prosječno 7,7 g. (raspon 1,1 do 30,6 g.),

a u dvije bolesnice koje su primile bubrežni presadak od živog srodnog darivatelja, liječenje dijalizom trajalo je 2,6 mj. i 5,2 mj.

Prije presađivanja bubrega, 23 (63,9%) bolesnika primila su transfuziju krvi, a u 12 (33,3%) od sveukupno 36 bolesnika ustanovljena su anti-HLA protutijela (PRA). Na posljednjem testiranju prije presađivanja, HLA protutijela su dokazana u pet (13,9%) bolesnika, od kojih je četiri već ranije liječeno presađivanjem bubrega. U 11 (30,6%) od sveukupno 36 primatelja postojali su značajni rizični čimbenici za neuspjeh liječenja presađivanjem bubrega: u tri bolesnika dugotrajno liječenje dijalizom, u sedam bolesnika uznapredovala srčanožilna bolest, a u jednog bolesnika ranije liječenje radikalnim operativnim zahvatom zbog karcinoma mokraćnog mjehura.

Darivatelji bubrega bili su u 22 (61,1%) slučajeva muškog spola. Prosječna dob muških darivatelja bila je 48,0 ±14,65 g., a ženskih darivatelja 51,1 g. ±10,15 g. Uzroci smrti bili su u 20 (55,6%) darivatelja cerebrovaskularna bolest, u 12 (33,3%) kraniocerebralna trauma, a u preostala tri (8,3%) ishemija mozga. Bubrežni presatci su u 34 slučaja dopremljeni u naš centar, što je imalo za posljedicu dužu hladnu ishemiju. Ona je trajala kod presadaka od umrle osobe 19,8 ±6,6 sati, a kod dva živa darivatelja 0,7 i 1,7 sati.

Slika 43 prikazuje HLA nepodudarnosti između darivatelja i primatelja. Jedna bolesnica dobila je bubrežni presadak bez HLA-nepodudarnosti, a nijedan bubreg nije presađen bolesniku s pet ili šest HLA nepodudarnosti. Promatrajući nepodudarnosti u DR lokusu, u 16 (44,4%) primatelja nije bilo nepodudarnosti s darivateljem, a 20 (55,6%) primatelja primilo je presadak s jednom HLA-DR nepodudarnosti.

Slika 43: HLA nepodudarnosti (A, B i DR lokus) između darivatelja i primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka

U svih 36 bolesnika primijenjena je indukcija monoklonskim protutijelom protiv IL-2 receptora daklizumab, uz trojnu imunosupresivnu terapiju koja je obuhvaćala kortikosteroid, mikofenolat mofetil i postupno uvođenje inhibitora kalcineurina. Od sveukupno 30 ispitanika, koji su podvrgnuti analizi staničnog ciklusa limfocita, u 17 (56,7%) bolesnika uveden je neposredno nakon presađivanja takrolimus, a u 13 (43,3%) ciklosporin. U kasnijem tijeku, u devet je bolesnika ciklosporin zamijenjen takrolimusom, dok je obrnuto, konverzija sa ciklosporina u takrolimus, učinjena u svega jedne bolesnice zbog neželjene pojave u vidu jakog ispadanja kose.

Dvadeset (55,6%) od sveukupno 36 bubrežnih presadaka, brzo je uspostavilo zadovoljavajuću funkciju, dok je u 16 (44,4%) bolesnika preuzimanje funkcije presatka bilo odgođeno, što je u 12 bolesnika zahtijevalo liječenje dijalizom. U deset (33,3%) od 30 bolesnika ispitne skupine, primijenjene su pulsne doze kortikosteroida zbog kliničke sumnje na reakciju odbacivanja, koja je u pet slučajeva potvrđena patohistološki. U jedne bolesnice, koja je podvrgnuta drugom postupku presađivanja bubrega i u koje su utvrđena anti-HLA protutijela (najviši prijetransplantacijski titar PRA bio je 80%, neposredno prije presađivanja 27%), patohistološki nalaz ukazivao je na humoralno odbacivanje. Pored pulsnih doza kortikosteroida, provedeno je liječenje plazmaferezom i imunoglobulinima, nakon čega je usljedila normalizacija funkcije presatka.

Od sveukupno 36 bolesnika, prije presađivanja bubrega su u 32 (88,9 %) bolesnika dokazana protutijela na CMV, dok su preostala četiri (11,1%) bolesnika bila

seronegativna. U 30 (83,3%) bolesnika dokazana su protutijela na EBV, dok za preostalih šest bolesnika podatci nisu dostupni. Postoperativnim praćenjem pp65 antigenemije, anti-CMV protutijela IgG i IgM i / ili CMV DNA dokazana je reaktivacija CMV infekcije u 19 (52,8%) bolesnika, od toga se u devet bolesnika razvila teška CMV bolest. U pet bolesnika ona se manifestirala sindromom enterokolitisa, a u preostala četiri slučaja pneumonitisom. Svi bolesnici izliječeni su parenteralnom primjenom ganciklovira uz modifikaciju doze imunosupresivnih lijekova.

Teže infekcije, uključujući CMV bolest, zahtijevale su bolničko liječenje i intravensku primjenu antibiotika u 19 (52,8%) od sveukupno 36 bolesnika. Dva (5,6%) bolesnika umrla su zbog sepse, s funkcionirajućim bubrežnim presatkom. Kirurške komlikacije zbog kojih je bilo neophodno invazivno ili kirurško liječenje, javile su se u 12 (33,3%) od sveukupno 36 ispitanika. U jedne bolesnice moralo se pristupiti hitnoj transplantektomiji, zbog rupture arterijske anastomoze u ranom poslijeoperacijskom tijeku.

U tri (8,3%) od sveukupno 36 bolesnika ustanovljeni su zloćudni tumori. U prvog bolesnika, koji je odbacio prvi bubrežni presadak i koji je 13 g. liječen dijalizom, dokazan je 4,9 mj. nakon presađivanja bubrega karcinom mokraćnog mjehura. U drugog bolesnika, koji je bio gotovo 10 g. na liječenju dijalizom, ustanovljen je 2,6 g. nakon presađivanja bubrega karcinom prostate. U trećeg bolesnika, koji je preko 14 g. liječen dijalizom, utvrđen je 1,1 g. nakon presađivanja bubrega karcinom prostate i 1,7 g. nakon presađivanja karcinom gušterače. Dva (5,6%) bolesnika umrla su zbog proširene maligne bolesti, s funkcionirajućim bubrežnim presatkom.

Od sveukupno 36 primatelja, prije presađivanja bubrega jedan (2,8%) bolesnik bolovao je od šećerne bolesti (tip II, inzulin ovisna), a 18 (50%) bolesnika liječeno je zbog arterijske hipertenzije. Nakon presađivanja bubrega, od sveukupno 35 bolesnika s funkcionirajućim presatkom, 30 (85,7%) bolesnika liječeno je zbog arterijske hipertenzije, a u tri (8,6%) bolesnika bila je neophodna primjena diuretika zbog nedostatnog izlučivanja vode i soli presatkom. U četiri (11,1%) bolesnika razvila se šećerna bolest, što je u dva slučaja zahtijevalo uvođenje liječenja inzulinom, a devetnaest (54,3%) bolesnika liječeno je zbog hiperlipoproteinemije.

Godinu dana nakon presađivanja, u 28 bolesnika s funkcionirajućim presatkom prosječni računski klirens kreatinina (prema Cockcroft-Gaultovoj formuli) bio je 54,1 ±16 ml/min, a prosječna koncentracija hemoglobina 129,1 ±15,7 g/l. Četrnaest (50%) bolesnika bilo je anemično.

Kumulativno preživljavanje bolesnika i presatka izračunato je po metodi Kaplan-Meier. Kod presađivanja bubrega od umrle osobe, jednogodišnje preživljavanje bolesnika bilo je 94,4%, presatka 90,9%, a dvogodišnje preživljavanje bolesnika 91,7% i presatka 88,1%. Kod presađivanja bubrega od živog srodnog darivatelja, dvogodišnje preživljavanje bolesnika i presatka bilo je 100%.

4.2.2. Analiza imunosnih parametara

4.2.2.1. Fenotipske promjene limfocita periferne krvi bolesnika nakon presađivanja bubrega

Na sljedećim slikama prikazana je zastupljenost pojedinih podvrsta limfocita periferne krvi bolesnika koji su podvrgnuti liječenju presađivanjem bubrega. Već prvog dana nakon presađivanja i uvođenja imunosupresije, uključujući i primjenu

daklizumaba, zastupljenost $CD3^+$ limfocita T naglo je pala u odnosu na početne, normalne vrijednosti (231). Nakon toga pratio se oporavak postotnog udjela ovih stanica među limfocitima do 15. dana, uz daljnji porast sve do 30. dana nakon presađivanja (slika 44). Postotna zastupljenost pomoćničkih $CD3^+CD4^+$ limfocita T pokazuje slično kretanje kao i zastupljenost $CD3^+$ limfocita periferne krvi (slika 45).

Citotoksični $CD3^+CD8^+$ limfociti T nisu pogođeni djelovanjem imunosupresivnog liječenja u istoj mjeri kao pomoćnički limfociti T. Tijekom promatranog razdoblja dolazi do porasta udjela ovih stanica u limfocitnoj podvrsti. Primjena daklizumaba nakon presađivanja bubrega ne pokazuje značajan utjecaj na promjene postotne zastupljenosti ovih stanica (slika 46).

Pokazalo se da je zastupljenost $CD19^+$ limfocita B već tijekom liječenja dijalizom niža od normalnih vrijednosti u općoj populaciji. Nakon uvođenja imunosupresije prati se postupni porast zastupljenosti ovih stanica u perifernoj krvi, iako tijekom promatranog razdoblja nisu dosegnute prosječne vrijednosti normalnog raspona zdrave populacije (slika 47).

Relativni udio stanica NK nakon presađivanja i primjene imunosupresivnih lijekova naglo raste, što ukazuje na to da imunosupresivni lijekovi ne smanjuju njihovu postotnu zastupljenost. Tijekom daljnjeg razdoblja praćenja normalizirao se postotni udio ovih stanica u perifernoj krvi (slika 48).

Praćenjem zastupljenosti IL2R na $CD3^+$ limfocitima T periferne krvi, utvrdili smo da primjena daklizumaba dovodi do gotovo potpunog gubitka izražaja ovog biljega na limfocitima T i da njegova razina u razdoblju praćenja ostaje trajno niska. Pored limfocita T periferne krvi, IL2R u većoj mjeri izražavaju stanice NK ($CD3^-$ limfociti). Iako je zastupljenost IL2R na ovim limfocitima relativno niska, primjena

daklizumaba dovodi do varijacija razine njegovog izražaja. Do kraja razdoblja praćenja, zastupljenost $IL2R^{+}CD3^{-}$ stanica konstantno pada (slika 49).

Limfociti T i B1 limfociti B normalno izražavaju CD5 biljeg. Na slici 50 prikazano je da promjene u postotnoj zastupljenosti CD5 biljega prate promjene zastupljenosti $CD3^{+}$ stanica periferne krvi, dok je zastupljenost $CD19^{+}CD5^{+}$ limfocita B1 prije i tijekom razdoblja praćenja nakon presađivanja bubrega vrlo niska (slika 51).

Slika 44: Postotna zastupljenost $CD3^{+}$ limfocita T u perifernoj krvi primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka (strelice označavaju dane primjene daklizumaba)

Slika 45: Postotna zastupljenost pomoćničkih $CD3^{+}CD4^{+}$ limfocita T u perifernoj krvi primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka (strelice označavaju dane primjene daklizumaba)

Slika 46: Postotna zastupljenost citotoksičnih $CD3^{+}CD8^{+}$ limfocita T u perifernoj krvi primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka (strelice označavaju dane primjene daklizumaba)

Slika 47: Postotna zastupljenost $CD19^{+}$ limfocita B u perifernoj krvi primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka (strelice označavaju dane primjene daklizumaba)

Slika 48: Postotna zastupljenost $CD56^+CD16^+$ stanica NK u perifernoj krvi primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka (strelice označavaju dane primjene daklizumaba)

Slika 49: Postotna zastupljenost IL2R (CD25) na $CD3^+$ limfocitima T (**A)** i postotna zastupljenost IL2R (CD25) na $CD3^-$ limfocitima (**B)** u perifernoj krvi primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka (strelice označavaju dane primjene daklizumaba)

Slika 50: Postotna zastupljenost $CD5^+$ stanica u perifernoj krvi primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka (strelice označavaju dane primjene daklizumaba)

Slika 51: Postotna zastupljenost $CD19^+CD5^+$ limfocita B (B1 podvrsta limfocita B) u perifernoj krvi primatelja bubrežnog presatka od 1. prosinca 2006. do 1. prosinca 2008. g. u KBC-u Rijeka (strelice označavaju dane primjene daklizumaba)

4.2.2.2. Analiza staničnog diobenog ciklusa limfocita periferne krvi bolesnika nakon presađivanja bubrega

Stanični diobeni ciklus analizirali smo kod bolesnika tijekom prvih šest tjedana nakon presađivanja bubrega, te u kontrolnim skupinama zdravih darivatelja krvi i bolesnika na liječenju redovitom dijalizom. Izolirani limfociti stimulirani su *in vitro* s anti-CD3 protutijelima tijekom tri dana, nakon čega smo protočnom citometrijom određivali postotnu zastupljenost stanica u mirujućoj G_0/G_1 fazi te u proliferativnim S i G_2+M fazama. Uzorci za kontrolu postupka određivanja staničnog

ciklusa bili su spontano proliferirajući limfociti te limfociti tretirani s 0,1 μg/ml daklizumaba bez dodatne stimulacije. Antiproliferativno djelovanje daklizumaba na anti-CD3 induciranu proliferaciju testirali smo *in vitro* u tri različite koncentracije, i to 0,1 μg/ml, 1 μg/ml i 10 μg/ml, s time da koncentracija od 1 μg/ml približno odgovara koncentraciji koja se postiže u bolesnika nakon primjene standardnih doza ovog lijeka. Na slici 52 prikazana je reaktivnost limfocita kontrolne skupine od 15 zdravih darivatelja krvi. Proliferativni odgovor mjerili smo zastupljenošću stanica u G_0/G_1 fazi staničnog ciklusa, pa vidimo da nakon stimulacije s anti-CD3 protutijelima dolazi do statistički značajnog ($p<0,001$) pada zastupljenosti stanica u G_0/G_1 fazi u odnosu na postotak stanica u skupini spontano proliferirajućih limfocita. Primjena daklizumaba dovodi do statistički značajnog ($p<0,001$) smanjenja proliferativnog odgovora, ovisno o dozi lijeka, iako se proliferacija niti u jednoj dozi ne smanjuje na razinu spontano proliferirajućih limfocita. Na slici 52 B prikazan je i učinak primjene daklizumaba bez anti-CD3 stimulacije, gdje možemo vidjeti da ovaj lijek, iako je blokator IL-2R, u primijenjenoj dozi potiče spontanu proliferaciju limfocita *in vitro*. Iste učinke možemo pratiti i na slici 53, na kojoj se može vidjeti zastupljenost stanica u proliferativnim S i G_2+M fazama staničnog ciklusa limfocita kontrolne skupine zdravih darivatelja krvi. Možemo vidjeti da anti-CD3 stimulacija dovodi do statistički značajnog ($p<0,001$) povećanja zastupljenosti stanica u S i G_2+M fazama staničnog ciklusa. Također možemo vidjeti da daklizumab, ovisno o dozi, statistički značajno ($p<0,001$) blokira anti-CD3 potaknutu proliferaciju.

Slika 52: Reaktivnost limfocita zdravih darivatelja krvi stimuliranih in vitro s anti-CD3 protutijelima (n=15); **A.** Pojedinačni prikaz reaktivnosti limfocita kontrolne

skupine; **B.** Zbirni prikaz reaktivnosti limfocita uz statističku analizu razlike srednjih vrijednosti skupine Studentovim T- testom

Slika 53: Reaktivnost limfocita zdravih darivatelja krvi stimuliranih in vitro s anti-CD3 protutijelima (n=15). Prikazana je zastupljenost stanica u fazi sinteze DNK te u proliferativnim fazama G_2+M. **A.** Pojedinačni prikaz reaktivnosti limfocita kontrolne skupine (stanice u S fazi staničnog ciklusa). **B.** Pojedinačni prikaz reaktivnosti limfocita kontrolne skupine (stanice u G_2+M fazama staničnog ciklusa). **C.** Zbirni prikaz reaktivnosti limfocita uz statističku analizu razlike srednjih vrijednosti skupine Studentovim T- testom (stanice u S fazi). **D.** Zbirni prikaz reaktivnosti limfocita uz statističku analizu razlike srednjih vrijednosti skupine Studentovim T- testom (stanice u G_2+M fazama staničnog ciklusa)

Slika 54 prikazuje zastupljenost limfocita periferne krvi bolesnika (n=30) nakon presađivanja bubrega u mirujućoj G_0/G_1 fazi staničnog ciklusa nakon stimulacije s anti-CD3 protutijelima. Stimulacija dovodi do statistički značajnog pada postotnog udjela mirujućih stanica u odnosu na spontano proliferirajuće stanice. Na slici 51 **A** vidimo da postotni udio mirujućih stanica tijekom ispitivanog razdoblja od šest tjedana postupno raste, dok na slici 51 **B**, koja prikazuje zastupljenost proliferirajućih stanica u S+ (G_2+M) fazama, vidimo da postotni udio stanica u mitozi opada. Ovaj rezultat posljedica je primjene imunosupresivnih lijekova.

Slika 54: Zastupljenost stanica u mirujućoj G_0/G_1 fazi (**A)**, u fazi sinteze DNK (S faza) (**B**) te u proliferativnim G_2+M fazama (**C**) staničnog ciklusa nakon stimulacije s anti-CD3 protutijelima limfocita periferne krvi bolesnika s bubrežnim presatkom

Na slici 55 vidimo usporedbu anti-CD3 potaknutog proliferativnog odgovora limfocita T bolesnika s bubrežnim presatkom u odnosu na odgovor limfocita zdravih darivatelja krvi. U ranom razdoblju nakon presađivanja nema razlike u mitotičkom potencijalu između limfocita bolesnika s presađenim bubregom i limfocita zdravih ljudi. Međutim, u kasnijem razdoblju, nakon osmog dana, proliferativni kapacitet limfocita periferne krvi bolesnika s presađenim bubregom opada, što se očituje statistički značajnim povećanjem zastupljenosti stanica u mirujućoj G_0/G_1 fazi ($p<0,001$) i statistički značajnim smanjenjem udjela stanica u proliferativnim S+ (G_2+M) fazama staničnog ciklusa.

Slika 55: Zastupljenost limfocita T periferne krvi bolesnika s presađenim bubregom u G_0/G_1 fazi (A), u S fazi (B) i u G_2+M fazama (C) staničnog ciklusa uspoređena je s kontrolnom skupinom zdravih ljudi; proliferativni odgovor kontrolnih stanica označen je kontrolnom razinom uz osjenčanu razinu standardne devijacije; razlike prosječnih vrijednosti testirane su primjenom Studentovog T-testa

Slika 56 prikazuje proliferativni odgovor limfocita T bolesnika s presađenim bubregom u usporedbi s bolesnicima na liječenju redovitom dijalizom. U ranom razdoblju nakon presađivanja bubrega ne postoji značajna razlika u odnosu na bolesnike na dijalizi, dok u kasnijem razdoblju (nakon 15-og dana) proliferativni odgovor bolesnika s presađenim bubregom postaje sve manji, što se očituje porastom broja stanica u G_0/G_1 fazi i padom postotnog udjela stanica u S i G_2+M fazama staničnog ciklusa.

Slika 56: Zastupljenost limfocita periferne krvi bolesnika s presađenim bubregom u G_0/G_1 fazi (**A**) u S fazi (**B**) i u G_2+M fazama (**C**) staničnog ciklusa uspoređena je s kontrolnom skupinom bolesnika na liječenju redovitom dijalizom (n= 8); proliferativni odgovor kontrolnih stanica obilježen je izrazom kontrolna razina uz osjenčanu razinu standardne devijacije; razlike prosječnih vrijednosti testirane su primjenom Studentovog T-testa

Na slici 57 prikazani su učinci primjene daklizumaba u kulturama limfocita T bolesnika s presađenim bubregom stimuliranih s anti-CD3 protutijelima. U svim ispitivanim terminima, povećanje koncentracije daklizumaba smanjuje proliferativni odgovor limfocita T.

Slika 57: Zastupljenost stanica u G_0/G_1 fazi (**A),** u fazi sinteze DNK (S faza) (**B**) i u proliferativnim fazama G_2+M (**C**) staničnog ciklusa anti-CD3 potaknutih limfocita T periferne krvi bolesnika s presađenim bubregom; primijenjene su tri različite koncentracije daklizumaba: 0,1 μg/ml, 1 μg/ml i 10 μg/ml

Na slici 58 može se vidjeti postupni pad reaktivnosti limfocita T te inhibicija anti-CD3 inducirane proliferacije ovisna o koncentraciji daklizumaba. Slabiji inhibicijski učinak daklizumaba u kasnijim ispitivanim terminima (nakon 16. dana) uzrokovan je prvenstveno padom reaktivnosti limfocita T u anti-CD3 stimuliranoj kulturi, a ne slabijim inhibicijskim učinkom daklizumaba.

Slika 58: Proliferacija limfocita T stimuliranih *in vitro* s anti-CD3 protutijelima uz primjenu različitih koncentracija daklizumaba; vertikalni stupci prikazuju raspon

između same anti-CD3 stimulacije i najsnažnije inhibicije postignute s koncentracijom daklizumaba od 10 μg/ml

Slika 59 prikazuje anti-CD3 potaknutu reaktivnost limfocita T primatelja bubrežnog presatka u danima prije i nakom primjene daklizumaba. U bolesnika je primijenjeno standardno imunosupresivno liječenje, u sklopu kojega su bolesnici 0., 15. i 30. dana primili daklizumab u dozi od 1 mg/kg tjelesne težine. Neposredno prije primjene lijeka te jedan dan kasnije, bolesnicima je izvađen uzorak krvi. Na slici 59 vidi se da *in vivo* primjena daklizumaba dovodi do smanjenja proliferativnog odgovora limfocita, što se očituje padom zastupljenosti stanica u proliferativnim S+ (G2+M) fazama staničnog ciklusa koje su zbirno prikazane. Šesnaestog dana ovaj pad je na razini statističke značajnosti ($p<0,05$).

Slika 59: Zbirni prikaz postotne zastupljenosti limfocita T u proliferativnim S+ (G2+M) fazama staničnog ciklusa nakon stimulacije s anti-CD3 protutijelima prije i nakon primjene daklizumaba u primatelja bubrežnog presatka; svi bolesnici su primali standardnu imunosupresivnu terapiju; razlike srednjih vrijednosti testirane su pomoću Studentovog T testa, a varijabilnost unutar skupina prikazana je standardnom devijacijom

5. RASPRAVA

Sve duži životni vijek uzrokuje stalni porast broja bolesnika na liječenju dijalizom, kao i na listi čekanja za presađivanje organa. Šećerna bolest, arterijska hipertenzija i ateroskleroza vodeći su uzroci završnog zatajivanja bubrega i povećavaju morbiditet bolesnika na liječenju dijalizom (232,233). Prema izvješću „Hrvatskog registra nadomještanja bubrežne funkcije" za 2005. g., primarno bubrežne bolesti (glomerulonefritis, pijelonefritis, intersticijski nefritis, policistična bolest bubrega, endemska nefropatija) zajedno čine tek oko trećinu uzroka završnog zatajivanja bubrega u RH (232). Medijan dobi bolesnika koji su 2005. g. u RH započeli liječenje dijalizom bio je 66 godina, a najviše je novih bolesnika bilo u skupini od 70-79 godina. Svega jedna desetina od ukupnog broja bolesnika na liječenju dijalizom u RH, nalazi se na listi čekanja Eurotransplanta za presađivanje bubrega od umrle osobe (slika 1) (234). U većine preostalih bolesnika liječenje presađivanjem bubrega onemogućuju prateća oboljenja, prvenstveno teške, uznapredovale komplikacije srčanožilnih i šećerne bolesti. Prema izvješću „Hrvatskog registra nadomještanja bubrežne funkcije" za 2005. g., mortalitet bolesnika na svim oblicima nadomjesnog liječenja bubrežnog zatajenja u RH bio je 13%, a srčanožilne bolesti bile su uzrokom smrti u više od polovine slučajeva (232). U bolesnika s presađenim bubregom, uzrok smrti bile su u 56% slučajeva srčanožilne bolesti, u 16% infekcije, a u 20% slučajeva malignomi (232).

Razvoj medicinskih znanosti omogućava proširivanje kriterija za prihvaćanje sve većeg broja primatelja i darivatelja organa, zbog čega i samo liječenje presađivanjem organa postaje sve zahtjevnije. Unatoč nedostatnom otkrivanju mogućih umrlih darivatelja, odbijanju darivanja organa i ograničenjima u zakonskoj

regulativi, u RH prati se stalni porast broja presađivanja bubrega (slika 2). Međutim, retrospektivna analiza kliničkih podataka o presađivanju bubrega u KBC-u Rijeka od 1985. do 2009. g. pokazuje stalno smanjenje broja presađivanja (slika 9). Pored toga, u našem centru sve se manje presađuju bubrezi sa živih darivatelja i postoji tendencija prelaska isključivo na presađivanje od umrlih osoba (slika 9). Tijekom proteklog 25-godišnjeg razdoblja u našem centru, bubrežni presadak bio je u 71,9% slučajeva od umrle osobe, a u 27,9% od živog srodnog darivatelja, većinom od roditelja (slike 10, 11). Budući da su rezultati liječenja bolji nego kod presađivanja bubrega od umrle osobe, u zemljama zapadne Europe i SAD-a sve se češće koriste živi srodni darivatelji uz rastuću tendenciju presađivanja sa živih nesrodnih darivatelja, najčešće od bračnih drugova (234-237). Usprkos tome, analiza podataka našeg centra o proteklom 25-godišnjem razdoblju nije pokazala statistički bolje preživljavanje presadaka od živog srodnog darivatelja u odnosu na presađivanje od umrle osobe (slika 25). Nakon odbacivanja prvog presatka, primatelj može biti senzibiliziran na darivateljeve HLA antigene, pa se kod idućeg presađivanja mora posvetiti posebna pažnja dobroj HLA podudarnosti, što za bolesnika znači duže čekanje na liječenju dijalizom. U literaturi se opisuje da, uz suvremeno imunosupresivno liječenje, razlika u preživljavanju presatka između prvog i drugog presađivanja bubrega postaje sve manja (238). U našem centru, gdje su se provodili prvenstveno postupci prvog presađivanja bubrega (92,7%), nije bilo statistički značajne razlike između preživljavanja presatka kod prvog u odnosu na drugi postupak presađivanja (slika 12, 26).

Tijekom proteklog 25-godišnjeg razdoblja, najčešći uzroci završnog bubrežnog zatajenja u naših primatelja bili su glomerulonefritis, pijelonefritis i intersticijski nefritis, te hipertenzivna bolest bubrega i nefroskleroza (slika 17). Usporedbom analiziranih razdoblja, uočeno je značajno smanjenje učestalosti

glomerulonefritisa, što može biti posljedica primjerenog liječenja infekcija antibioticima, napose streptokoknih infekcija (slika 17) (16). U literaturi se navodi da medijan dobi bolesnika koji započinju liječenje dijalizom stalno raste (232,233). U našem centru također je zabilježen porast prosječne dobi primatelja od 37,7 ±12,4 g. u prvom, na 46,3 ±13,5 g. u posljednjem analiziranom petogodišnjem razdoblju (slika 16). U europskim zemljama bilježi se veća incidencija muških bolesnika koji započinju nadomjesno liječenje dijalizom, što je u skladu s podatcima našeg centra, budući da su tijekom cjelokupnog 25-godišnjeg razdoblja približno dvije trećine primatelja bile muškog spola (slika 13) (233). Analizom petogodišnjih razdoblja utvrdili smo stalan i značajan pad udjela ženskih primatelja, iako se i ukupni broj muških bolesnika konstantno smanjivao (slika 14).

U vodećim svjetskim transplantacijskim centrima jednogodišnje preživljavanje bolesnika i bubrežnih presadaka iznosi više od 90%, a učestalost akutnih reakcija odbacivanja manje od 15% (86, 87,112-114,172). Poznato je da brojni čimbenici vezani uz darivatelje i primatelje te sam postupak eksplantacije, održavanja i implantacije organa, mogu utjecati na preživljavanje bolesnika i presatka. Najbolji uspjeh postiže se pravovremenim presađivanjem bubrega od živog srodnog darivatelja sa što boljom HLA podudarnošću. Od velikog značaja je i primjereno imunosupresivno liječenje, pravovremeno liječenje komplikacija te dobra suradnja bolesnika (41,239,240). Analiza naših podataka o proteklom 25-godišnjem razdoblju pokazala je statistički značajno lošije preživljavanje presadaka u slučajevima kada su primatelji ili darivatelji bili stariji od 50 g. (slika 27, 28). Pored toga, preživljavanje presadaka od ženskog darivatelja bilo je značajno lošije, osobito kada je primatelj bio muškog spola (slika 29). U naših bolesnika najbolje preživljavanje presadaka zabilježeno je u primatelja s policističnom bolesti bubrega, budući da ovi bolesnici

nisu u većoj mjeri izloženi dugogodišnjim štetnim utjecajima koji su prisutni u bolesnika s nefrosklerozom i dijabetičkom nefropatijom (slika 34). Prema rezultatima studije CTS, trajanje tople ishemije ne utječe značajno na ishod presađivanja (241). Međutim, poznato je da produžavanje trajanja hladne ishemije povećava reperfuzijsko oštećenje i da negativno utječe na preživljavanje presatka (238,241). Prema studiji CTS, najbolje preživljavanje presadaka bilo je kod trajanja hladne ishemije od sedam do dvanaest sati, a značajno lošije kod hladne ishemije kraće od šest sati. Dodatna analiza pokazala je da su bubrezi od umrle osobe s hladnom ishemijom kraćom od šest sati često presađivani bez obzira na HLA podudarnost, što je negativno utjecalo na preživljavanje (241). U našim rezultatima trajanje hladne ishemije, koje je u svih primatelja bilo kraće od 37 sati, nije značajno utjecalo na preživljavanje presatka (slika 36). Također je poznato da duže liječenje dijalizom prije presađivanja povećava rizik za gubitak presatka, odnosno povećava morbiditet i mortalitet primatelja (242). Analiza naših podataka tijekom 25-godišnjeg razdoblja praćenja pokazala je da trajanje liječenja dijalizom nije značajno utjecalo na preživljavanje presatka (slika 35).

Uvođenje modernih imunosupresivnih lijekova te poboljšanje kirurških tehnika i kliničkog praćenja bolesnika dovelo je do sve boljeg uspjeha liječenja presađivanjem bubrega. Najveća promjena opažena je nakon uvođenja ciklosporina sredinom 1980-ih godina (27,28,239,243). U našem centru također se prati stalno i značajno poboljšanje rezultata liječenja presađivanjem bubrega, izuzev razdoblja koje obuhvaća Domovinski rat (1991.-1995.g.), u kojem se bilježilo pogoršanje preživljavanja primatelja i presatka. Kumulativno jednogodišnje preživljavanje primatelja kod presađivanja u razdoblju od 2001. do 2007.g. iznosilo je 95,5 ±1,8%, a presadaka 89 ±2,7%, dok je petogodišnje preživljavanje bolesnika bilo 88,3 ±3,4% i presadaka 75,4 ±4,4% (slike 20, 21).

Rizik za reakciju odbacivanja je najveći u prvih šest mjeseci, a zatim postupno opada. Nakon prve godine rizik za gubitak presatka ostaje približno jednak (244,245). Tijekom prve godine nakon presađivanja bubrega, u približno dvije trećine primatelja javljaju se infektivne komplikacije, koje kod oko 20% bolesnika uzrokuju smrt (246-248). Oportunističke infekcije javljaju se najčešće od drugog do šestog mjeseca nakon presađivanja. Najvažnija je citomegalovirusna infekcija, koja se razvija u do 80% primatelja, a klinički se manifestira u 8 do 32% slučajeva, što ovisi o intenzitetu primijenjene imunosupresije i metodama praćenja citomegalovirusnih biljega (249,250). Citomegalovirusna infekcija ima imunomodulacijsko djelovanje. S jedne strane može izazvati reakciju odbacivanja presatka, a s druge strane može povećati sklonost oportunističkim infekcijama. Citomegalovirusna infekcija može uzrokovati akutnu ili kroničnu disfunkciju presatka, ali i gubitak njegove funkcije (121). U našem centru primjenjuje se preemptivno liječenje citomegalovirusne infekcije. U početku razdoblja praćenja određivana je pp65 antigenemija, a po nestanku reagensa počelo se, pored specifičnih protutijela IgG i IgM, određivati i citomegalovirusnu DNK. Analizom učestalosti citomegalovirusne infekcije u naših primatelja bubrežnog presatka od 2006.-2008. g., ustanovili smo reaktivaciju citomegalovirusne infekcije u polovine (52,8%) bolesnika, dok se u četvrtine (25,0%) svih primatelja bolest manifestirala ozbiljnom kliničkom slikom. Ovi podatci potvrđuju opravdanost profilakse valganciklovirom ili ganciklovirom, koja se danas rutinski primjenjuje u vodećim transplantacijskim centrima (121).

U današnje vrijeme niska učestalost odbacivanja postavlja nove ciljeve liječenja, kao što su bolja funkcija presatka, smanjenje učestalosti komplikacija i njihovo liječenje (arterijska hipertenzija, hiperlipoproteinemija, dijabetes melitus, toksična djelovanja lijekova, infekcije, maligni tumori) te sprječavanje kasnog

pogoršanja funkcije presatka. Unatoč vrlo učinkovitom imunosupresivnom liječenju, kronična nefropatija presatka predstavlja vodeći uzrok gubitka njegove funkcije (251). Njezinom razvoju pogoduju imunosni i neimunosni čimbenici, primjerice akutno odbacivanje, HLA nepodudarnost, nedostatna doza imunosupresivnih lijekova ili njihovo štetno djelovanje, te nesuradnja bolesnika. Dugotrajno preživljavanje presatka značajno ovisi o stupnju tkivne podudarnosti između primatelja i darivatelja, te o funkciji presatka. Primatelji, u kojih je nakon prve godine od presađivanja funkcija presatka uredna, imaju bolje očekivano preživljavanje presatka od onih s poremećenom funkcijom presatka (252). Vodeći uzroci smrti u primatelja bubrežnog presatka su srčanožilne bolesti, infekcije i zloćudni tumori, što je pokazala i naša analiza podataka u proteklom 25-godišnjem razdoblju (slika 22) (253). Već je 1970-ih godina uočena veća učestalost malignih tumora u primatelja bubrežnog presatka, i povezana je s primjenom imunosupresije (254,255). Zbog sve dužeg preživljavanja presatka, prihvaćanja sve starijih primatelja i darivatelja bubrega, te primjene snažnijeg imunosupresivnog liječenja, maligni tumori postaju sve veći problem (256). Među zloćudnim tumorima u primatelja bubrežnog presatka najčešće se javljaju karcinom kože i poslijetransplantacijska limfoproliferativna bolest, a češći su i karcinom debelog crijeva i bubrega (257). Među zloćudnim tumorima, u naših primatelja najčešće je zabilježen karcinom kože, a potom karcinom bubrega i uretera (slika 23). Za razliku od drugih registara, naša analiza pokazuje visoku učestalost karcinoma prijelaznog epitela u bolesnika s endemskom nefropatijom nakon presađivanja bubrega (tablica 5) (230). U ovih bolesnika opisan je poseban spektar mutacija p53, koji je sličan spektru kod nefropatije uzrokovane biljnim preparatima na bazi kineskih trava (engl. Chinese herb nephropathy), koja se manifestira kao tubulointersticijska bolest, slična endemskoj nefropatiji (230,258,259). U bolesnika s

„Chinese herb nefropatijom" u završnom stadiju bubrežnog zatajivanja također je uočena visoka učestalost karcinoma urotela gornjeg mokraćnog sustava (>40%) (260). U bolesnika s endemskom nefropatijom i „Chinese herb nefropatijom", imunosupresivno liječenje nakon presađivanja bubrega može imati ozbiljne posljedice, s čime bolesnike treba upoznati prije presađivanja. Potrebno je činiti redovne nefrološke i urološke preglede te savjetovati bilateralnu nefroureterektomiju (230,260,261).

Uspjeh liječenja presađivanjem značajno ovisi o razvoju prilagodbe između primatelja i presatka te pojavi tolerancije. Sveukupni imunosni odgovor na presađeni organ, s jedne strane uključuje reakciju odbacivanja, međutim s druge strane aktivira regulacijske stanice (T reg), koje mogu inducirati specifičnu toleranciju na antigene presatka. Mehanizmi ovog djelovanja predmet su suvremenih istraživanja. Otkriveni su složeni mehanizmi imunosnog odgovora na presadak, isprva na razini stanica, potom na razini molekula i gena. Kod reakcije odbacivanja, oštećenje presatka prvenstveno je uzrokovano staničnom imunosti koju posreduju limfociti T te humoralnom imunosti koju posreduju protutijela (70-72,262,263). Posljednjih desetak godina otkrilo se da značajnu ulogu u reakciji odbacivanja ima međudjelovanje mehanizama prirođene i stečene imunosti. Pokazalo se da sustav komplementa, pored mogućnosti izravne lize stanica, također ima značajnu ulogu u imunosnoj reakciji posredovanoj protutijelima, budući da s njima stvara komplekse koji napadaju membranu (MAC, prema engl. membrane attack complex). Ovo se humoralno odbacivanje manifestira klinički s hiperakutnom reakcijom odbacivanja, zbog postojanja ranije stvorenih protutijela na HLA ili AB0 antigene, a može se očitovati kao akutna reakcija odbacivanja. Sustav komplementa ima i brojne druge uloge, uključujući poticanje aktivacije stečene imunosti putem komponenti C3 i C5. Ranije

se smatralo da presadak oštećuju $CD8^+$ citotoksični limfociti T, međutim danas je poznato da i $CD4^+$ limfociti T mogu izazvati reakciju odbacivanja neovisno o $CD8^+$ limfocitima T. Citolitički limfociti T brojnim mehanizmima uništavaju ciljne stanice, uključujući sustav perforin/ granzim, Fas/ FasL i granulizin (75). Neke od ovih mehanizama u reakciji odbacivanja mogu posredovati $CD4^+$ limfociti T, kao i stanice NK. Prepoznavanje antigena rezultira aktivacijom limfocita T, što uključuje široku lepezu molekula na membrani limfocita T i antigen predočnih stanica. Ove molekule omogućuju odgovarajuće međudjelovanje između T staničnog receptora i MHC molekule (signal 1), a među njima se ističu CD4 ili CD8, CD2, LFA1 i CD45 molekule. Za punu aktivaciju limfocita T neophodan je drugi signal koji obuhvaća nekoliko mehanizama koji se međusobno nadopunjuju i preklapaju, a uključuju CD28 na limfocitu T, koji se veže za CD80 (B7-1) i/ili CD86 (B7-2) na antigen predočnoj stanici, CD154 na limfocitu T, koji se veže za CD40, kao i novačenje niza drugih liganda (264). MHC nepodudarnost novači veliki broj T limfocitnih klonova, za koje se zna da pripadaju Th1, Th2 i Th17 profilu, i koji mogu izazvati reakciju odbacivanja. $CD4^+$ stanice mogu poticati različite odgovore izvršnih limfocita T, ali neke od njih mogu i ometati, tj. regulirati (regulacijski limfociti T, $CD4^+CD25^+$). Pokazalo se da su ove stanice potrebne za razvoj tolerancije, te da njihovo preživljavanje ovisi o citokinima limfocita T, prvenstveno IL-2 (265). Regulacijski limfociti T su prisutni u svim perifernim limfatičkim tkivima, a proizvodi ih timus kao posebnu lozu. Oni izražavaju CD25 (α lanac IL-2R), čimbenik prepisivanja Foxp3, brojne druge citokine i citolitičke molekule (npr. perforin, granzim), ali ne luče IL-2 (266-269). Zabilježeno je da se kod fiziološkog omjera $CD4^+CD25^+$ limfocita T prema $CD4^+CD25^-$ limfocitima T (manje od 1:10) može tek djelomično ometati

aloimunosni odgovor. Međutim, veći omjeri (na primjer 1:1) koji se mogu postići *in vivo* masovnom deplecijom limfocita T, mogu dovesti do razvoja tolerancije.

Primjenom kombinacije imunosupresivnih lijekova nastoji se suzbiti transplantacijska reakcija na više razina, kako bi se izbjegla reakcija odbacivanja posredovana obilaznim, redundantnim putevima. Pored toga, neki lijekovi pokazuju aditivni ili sinergijski učinak, što omogućuje smanjenje doze, a time i štetnog djelovanja. Različiti imunosupresivni protokoli najčešće uključuju inhibitor kalcineurina, mikofenolnu kiselinu, kortikosteroid te antilimfocitna monoklonska ili poliklonska protutijela. Ispituju se protokoli u kojima se, zbog štetnih učinaka, inhibitori kalcineurina i/ili kortikosteroidi primjenjuju u nižoj dozi, ukidaju ranije ili zamjenjuju s drugim imunosupresivnim lijekovima, kao što su anti-CD25 monoklonska protutijela, poliklonska protutijela, TOR inhibitori ili belatacept (146,270-272). Nejasno je u kojem su trenutku prednosti slabije imunosupresije uravnotežene ili nadvladane nedovoljnom zaštitom od akutne ili subkronične reakcije odbacivanja. Rezultati studije CTS pokazali su da tijekom druge godine nakon presađivanja bubrega smanjenje dnevne doze ciklosporina na 150 mg, takrolimusa na 2 mg ili mikofenolat mofetila na 1 g uz ciklosporin, odnosno 0,5 g uz takrolimus, ili niže od toga statistički značajno pogoršava preživljavanje presatka. Ukidanje inhibitora kalcineurina ili mikofenolat mofetila dvije godine nakon presađivanja, također povećava rizik za gubitak presatka (240). Imunosupresivni protokol, koji se rutinski primjenjuje u KBC-u Rijeka, obuhvaća inhibitor kalcineurina, mikofenolat mofetil, kortikosteroid i anti-CD25 monoklonsko protutijelo daklizumab. Inhibitori kalcineurina smanjuju aktivaciju limfocita, dok mikofenolna kiselina prvenstveno ometa proliferaciju aktiviranih limfocita T u IL-2 ovisnom putu, djelujući na G_1 kontrolnu točku u staničnom ciklusu (91). Na stanični ciklus djeluju i TOR inhibitori

ometajući G_1 i S fazu, čime smanjuju proliferaciju hematopoetskih i nehematopoetskih stanica ovisnu o citokinima (71). Kortikosteroidi, pored specifičnog djelovanja na makrofage i limfocite T kojim ometaju stečenu i prirođenu imunost, imaju široko nespecifično imunosupresivno i protuupalno djelovanje. Za indukcijsko liječenje koriste se deplecijska ili nedeplecijska antilimfocitna protutijela, a kod ranije senzibilizacije odstranjuju se anti-HLA reaktivni limfociti primjenom IVIG i plazmafereze.

Humanizirana monoklonska protutijela, blokatori receptora za interleukin-2 (CD25) daklizumab i baziliksimab, koriste se u KBC-u Rijeka od 1997. g. u indukcijskoj imunosupresivnoj terapiji kod presađivanja bubrega. Dokazano je da njihova primjena smanjuje učestalost akutnog odbacivanja presatka, što se pokazalo i u naših primatelja (273). Protutijela na IL-2 receptor dovela su do ponovnog oživljavanja korištenja indukcijske terapije protutijelima, jer za razliku od poliklonskih protutijela, ne uzrokuju depleciju limfocita T i oslobađanje citokina, zbog čega ne izazivaju značajne neželjene pojave (69-71). Ona se vežu za α lanac IL-2 receptora (CD25), koji se pojačano izražava na aktiviranim limfocitima T. Ovim vezivanjem zaustavljaju odgovor posredovan IL-2, odnosno prolazak kroz stanični ciklus i diobu stanice, ometajući G_1 fazu staničnog ciklusa. Važno djelovanje anti-CD25 monoklonskih protutijela je pojačavanje učinaka inhibitora kalcineurina, koji smanjuju proizvodnju IL-2. Međutim, primjena anti-CD25 monoklonskih protutijela ne omogućava odgođeno uvođenje inhibitora kalcineurina. Dosadašnji radovi pokazuju da daklizumab specifično blokira rane faze prijenosa signala preko IL-2 receptora te da blokira Jak/Stat put prijenosa signala u stanicama, čime se blokira stanična dioba (93,94). Djelovanje ovog lijeka ne mijenja značajno zastupljenost pojedinih vrsta limfocita T, limfocita B ili stanica prirodnih ubojica (NK). Međutim,

zastupljenost $CD3^+CD25^+$ stanica neposredno nakon početka primjene ovog lijeka značajno pada s 15-30% na manje od 3% (95,96,100). Pored djelovanja daklizumaba, ispitivano je i djelovanje njegovog analoga baziliksimaba, koji je pokazao vrlo slično djelovanje na $CD3^+CD25^+$ stanice, ali je njegov učinak tijekom 6.-8. tjedna od primjene bio značajno jači od djelovanja daklizumaba (97). Mehanizam djelovanja anti-CD25 blokade nije vezan samo na inhibiciju proliferacije, nego i ometanje IL-15 i IL-7 aktivacijskog puta, budući da navedeni lijekovi nishodno reguliraju zajednički IL2/IL15 beta lanac receptora (98). Jedan od mehanizama imunosupresivnog djelovanja daklizumaba je i izravna inhibicija izražaja CD40L molekule na membrani pomoćničkih limfocita T (99). Provedena su ispitivanja s različitim dozama daklizumaba i u nekim centrima se određuje njegova koncentracija u krvi. Pokazalo se da primjena lijeka u dvije doze od 1 mg/kg tjelesne težine postiže zadovoljavajući imunosupresivni učinak, dok primjena daklizumaba u pet doza od 1 mg/kg, uz rano ukidanje kortikosteroida, smanjuje rizik od srčanožilnih bolesti (101-103).

Akutna reakcija odbacivanja je u većini slučajeva potpuno asimptomatska i u mnogim centrima se, uz suvremeno imunosupresivno liječenje, njezina učestalost smanjila na ispod 15% (274,275). Akutno odbacivanje definirano je kao akutno pogoršanje funkcije presatka, koje je povezano sa specifičnim patohistološkim promjenama u njemu. U definiciji se, uslijed nedostatka imunosnih pokazatelja, u procjeni prisustva reakcije odbacivanja koristi porast koncentracije serumskog kreatinina koji je, međutim, relativno kasni pokazatelj reakcije odbacivanja i označava postojanje već značajnog histološkog oštećenja organa. U svrhu ranog otkrivanja reakcije odbacivanja, u nekim transplantacijskim centrima vrše se učestale biopsije (protokol biopsije), dok se u drugim centrima ispituju neinvazivne metode imunosnog praćenja. Prije presađivanja rutinski se ispituje postojanje anti-HLA protutijela na

panelu davatelja limfocita (PRA), jer njihovo prisustvo ukazuje na visoki rizik za razvoj reakcije odbacivanja (186,191,193). Međutim, korisnost ove metode je ograničena, jer većina bolesnika nema anti-HLA protutijela, a reakciju odbacivanja mogu posredovati i molekule sporednog sustava tkivne podudarnosti (non HLA protutijela) (193,198). Prema tome, ne postoji pouzdana metoda koja može nedvosmisleno ukazati na prisustvo reakcije odbacivanja.

U želji da odredimo razinu imunosupresije u bolesnika s bubrežnim presatkom, u prospektivnom dijelu istraživanja pratili smo nekoliko imunosnih parametara. Proliferativni odgovor limfocita bolesnika s bubrežnim presatkom testirali smo na dva načina. Kao prvo, pratili smo spontanu proliferaciju limfocita dobivenih od navedenih bolesnika, a kao drugo, pratili smo i proliferativni odgovor limfocita potaknutih s anti-CD3 protutijelima (OKT3) (slika 54). Usprkos individualnim razlikama između ispitivanih 30 bolesnika, utvrdili smo da njihov proliferativni odgovor tijekom prvih 45 dana postupno slabi. Neposredno nakon presađivanja nema razlike u mitotičkoj aktivnosti ovih stanica prema kontrolnim skupinama koje su sačinjavali zdravi darivatelji krvi i bolesnici na liječenju redovitom dijalizom, dok se nakon osmog dana od presađivanja bilježi statistički značajno slabiji proliferativni odgovor u odnosu na kontrolne skupine (slike 55, 56). Proliferativni odgovor pratili smo metodom određivanja zastupljenosti stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa, i to u mirujućoj G_1/G_0 i mitotički aktivnim S i G_2+M fazama. Koristili smo kolorimetrijsku metodu, koja za razliku od dosadašnjih široko korištenih metoda određivanja proliferativnog odgovora, nije bazirana na korištenju radioaktivnih tvari. Osim toga, ova metoda analize mitotičkog potencijala stanica relativno je jednostavna i jeftina te se može izvesti u relativno kratkom vremenu.

Navedeno slabljenje proliferativnog odgovora izravna je posljedica primijenjenog imunosupresivnog liječenja. Pratili smo bolesnike kojima je u sklopu standardnog imunosupresivnog protokola davan daklizumab, hibridno (90% humano, 10% mišje) monoklonsko protutijelo na alfa lanac IL-2 receptora (CD25), koje blokira proliferaciju antigen-specifičnih aktiviranih limfocita T. U našim rezultatima primijetili smo da je daklizumab poticao spontanu proliferaciju limfocita T, iz čega proizlazi da on može, iako je blokator IL-2R, djelovati i agonistički na proliferaciju stanica. Međutim, u anti-CD3 induciranim kulturama primijećena je blokada proliferacije ovisna o dozi, što je u skladu s njegovim općepoznatim *in vivo* djelovanjem (slika 52, 53) (95,96,100).

Pored *in vitro* učinaka daklizumaba, pratili smo i njegovo *in* vivo djelovanje na zastupljenost pojedinih limfocitnih podvrsta periferne krvi bolesnika s presađenim bubregom. Vidjeli smo da daklizumab sam po sebi ne inducira promjene u zastupljenosti limfocitnih podvrsta. Međutim, daklizumab snažno snižava postotni udio IL-2R$^+$ stanica, što se naročito odnosi na CD3$^+$CD25$^+$ limfocite T, ali i na CD3$^-$ CD25$^+$ limfocite, koje sačinjavaju prvenstveno stanice NK (slika 49). Sveukupni učinak imunosupresivnog liječenja neposredno nakon presađivanja bubrega rezultira snažnim padom zastupljenosti CD3$^+$ limfocita T i njihovih podvrsta, pomoćničkih i citotoksičnih stanica, zatim limfocita B kao i CD5$^+$ stanica periferne krvi (limfociti T i B1 limfociti B) (slika 44-47, 50, 51). Ovaj pad u zastupljenosti ne zahvaća i stanice NK, čiji postotni udio u perifernoj krvi neposredno nakon presađivanja raste (slika 48). Tijekom daljnjeg razdoblja praćenja, postotni udio pomoćničkih i citotoksičnih limfocita T se normalizira. Testirajući krv bolesnika prije i nakon davanja daklizumaba, primijetili smo da daklizumab ne dovodi do većih fenotipskih promjena u zastupljenosti stanica, što je u skladu s podatcima u literaturi (95,96,100).

Zabilježeni pad reaktivnosti limfocita izravna je posljedica zajedničkog djelovanja svih primijenjenih imunosupresivnih lijekova. Ipak, u bolesnika smo utvrdili smanjenje reaktivnosti limfocita T, kao neposrednu posljedicu davanja daklizumaba, što je utvrđeno drugog dana nakon njegove primjene (slika 59). *In vitro* testiranje djelovanja daklizumaba pokazalo je da blokada anti-CD3 inducirane proliferacije limfocita T ovisi o dozi lijeka. Ovi rezultati dobiveni su na limfocitima kontrolnih skupina, dakle limfocitima darivatelja krvi i bolesnika na liječenju redovitom dijalizom, kao i na limfocitima bolesnika koji su primali daklizumab. Očekivalo se da će daklizumab *in vitro* slabije djelovati na limfocite koji su bili izloženi djelovanju ovog lijeka *in vivo*, te da će se to moći kvantificirati određivanjem intenziteta proliferacije stanica. Međutim, utvrđeno je da je slabiji inhibicijski učinak daklizumaba (raspon između čiste anti-CD3 stimulacije i najučinkovitije doze daklizumaba), naročito u kasnijim terminima, uzrokovan ukupnim padom reaktivnosti limfocita T, a ne slabijim djelovanjem daklizumaba, što bi se očekivalo u prvom, 16. i 31. danu nakon presađivanja, dakle u danima neposredno nakon primjene daklizumaba u bolesnika (slika 58).

Temeljni ciljevi primjene imunosupresivnih lijekova su suzbijanje imunosnog odgovora na strani antigen sa što većom specifičnošću, kako bi se što više smanjio rizik infekcije ili pojave maligne bolesti te izbjegla toksičnost lijekova. Poznato je da su vodeći uzroci smrti bolesnika s bubrežnim presatkom srčanožilne bolesti, infekcije i maligni tumori. Osnovna klinička dvojba u liječenju bolesnika s presađenim bubregom, osobito onih koji su ranije liječeni od malignog tumora ili bolesnika s endemskom nefropatijom koji su skloni razvoju karcinoma urotela, jest intenzitet potrebne imunosupresije. Preslaba imunosupresija dovodi do pogoršanja funkcije ili odbacivanja presatka, a prekomjerna imunosupresija uzrokuje nuspojave lijekova,

pogoduje razvoju infektivnih komplikacija i pojavi malignih tumora. Kako se tijekom liječenja primatelj i presadak prilagođavaju jedan drugome, smanjuje se vjerojatnost odbacivanja i potrebna doza imunosupresiva. Idealno bi bilo da postoji metoda kojom bi se mogao procijeniti imunosni odgovor i prema tome individualizirati imunosupresiju, kako bi se poboljšalo preživljavanje presatka, smanjio morbiditet i mortalitet. Time bi se moglo prepoznati odbacivanje u najranijoj fazi, što je od osobite koristi u odgođenom preuzimanju funkcije presatka, koje može potrajati i koji tjedan. Za sada se imunosupresivni lijekovi doziraju prema protokolima baziranim na kliničkom iskustvu (emprijski), koji uzimaju u obzir rizike prekomjerne ili nedostatne imunosupresije. S jedne strane, to je moguće odbacivanje organa, a s druge strane infekcije, razvoj malignih tumora i drugi neželjeni učinci imunosupresivnih lijekova. Zbog toga je za individualizirano imunosupresivno liječenje neophodan razvoj metoda imunosnog praćenja, te prospektivne kontrolirane studije kojiima bi se utvrdio značaj ovih metoda u praćenju bolesnika s bubrežnim presatkom.

Znanstveni doprinos rada očituje se u eksperimentalnim podatcima o proliferativnom odgovoru limfocita T periferne krvi bolesnika s presađenim bubregom i učincima blokatora IL-2R daklizumaba u ranom razdoblju nakon presađivanja. Budući da je reaktivnost lilmfocita obrnuto razmjerna razini imunosupresivnog liječenja, očigledno je da ovi podatci mogu imati veliko značenje u doziranju lijekova i izbjegavanju niza neželjenih učinaka prekomjerne imunosupresije, kao što su infektivne komplikacije i maligne bolesti. Analiza utjecaja niza imunoloških i neimunoloških čimbenika na preživljavanje bolesnika i bubrežnog presatka u KBC-u Rijeka u proteklih 25 godina može pomoći u pravilnijem doziranju lijekova i optimizaciji poslijetransplantacijskog praćenja bolesnika, te omogućiti daljnje poboljšanje preživljavanja presatka i bolesnika.

6. ZAKLJUČCI

1. Postupku presađivanja bubrega u posljednjih 15 g. pristupa statistički značajno više starijih osoba (osobe preko 40 g. starosti života) nego u prethodnom desetogodišnjem razdoblju.
2. Među osnovnim bubrežnim bolestima, koje uzrokuju završni stadij bubrežnog zatajenja, statistički je značajno manje glomerulonefritisa zabilježeno u posljednjih 15 g. u odnosu na prethodno desetogodišnje razdoblje.
3. Lošije preživljavanje presatka bilježeno je kod primatelja i darivatelja starijih od 50 g., te u slučajevima kada su muški primatelji primili presadak od ženskog darivatelja.
4. Bolje preživljavanje presatka bilježeno je kod primatelja u kojih je uzrok bubrežnog zatajenja bila policistična bolest bubrega te kod presađivanja bubrega AB0 identičnog darivatelja.
5. Vodeći uzroci smrti primatelja bubrežnog presatka su srčanožilne bolesti, infekcije i maligni tumori. Incidencija malignih tumora osobito raste kod primatelja starijih od 60 g.
6. U bolesnika s endemskom nefropatijom bilježi se statistički značajno veća učestalost karcinoma urotela, nego u bolesnika oboljelih od završnog bubrežnog zatajenja nekog drugog uzroka.
7. Uvođenjem modernih imunosupresivnih lijekova bilježi se sve duže preživljavanje bolesnika nakon presađivanja bubrega, osobito u posljednjih deset godina. Paralelno s time, značajno se poboljšava i preživljavanje bubrežnih presadaka.
8. Imunosupresivno liječenje u ranoj fazi nakon presađivanja bubrega dovodi do značajnog pada zastupljenosti $CD3^+$ limfocita T i njihovih podvrsta, $CD4^+$

pomoćničkih limfocita T i $CD8^+$ citotoksičnih limfocita T, te limfocita B i $CD5^+$ stanica. Postotni udio ovih stanica u kasnijem razdoblju, od drugog do šestog tjedna nakon presađivanja, ponovno se normalizira.

9. Neposredno nakon presađivanja bubrega, usprkos imunosupresivnom liječenju, bilježi se povećanje zastupljenosti stanica NK, što se u kasnijem razdoblju normalizira.
10. Liječenje daklizumabom snažno i trajno snižava izražaj IL-2R na stanicama periferne krvi, naročito na $CD3^+$ limfocitima T.
11. *In vitro* stimulacija limfocita periferne krvi bolesnika s presađenim bubregom dovodi do značajnog pada zastupljenosti stanica u mirujućoj G_0/G_1 fazi i porasta zastupljenosti stanica u proliferativnim S i G_2+M fazama. Intenzitet ovih zbivanja odražava proliferativnu reaktivnost stanica.
12. Analizom staničnog ciklusa utvrđeno je da je proliferativni odgovor limfocita bolesnika s presađenim bubregom u kasnijim fazama nakon presađivanja manji u odnosu na kontrolne skupine zdravih darivatelja krvi i bolesnika na liječenju redovitom dijalizom.
13. *In vitro* istraživanjem utvrdili smo da daklizumab u dozi od 0,1 μg/ml, bez antigenske stimulacije stanica, ima agonistički učinak na proliferaciju limfocita T.
14. Analiza staničnog ciklusa pomoću protočnog citometra je neinvazivna, jednostavna, jeftina i relativno pouzdana metoda za određivanje imunosne reaktivnosti, koja je u bolesnika s presađenim bubregom obrnuto razmjerna razini imunosupresije.

7. LITERATURA

1. Graham T. The Bakerian lecture. On osmotic Force. Philos Trans R Soc Lond 1854;144:177-228.
2. Rabađija L. Dijaliza. U: Šercer A, Grmek MD, ur. Medicinska enciklopedija 2. Zagreb: Jugoslavenski leksikografski zavod; 1967, str.112-4.
3. Drukker W. Hemodialysis: a historical review. U: Maher JF, ur. Replacement of renal function by dialysis. 3. izd. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1989, str. 20-86.
4. Abel JJ, Rowntree LC, Turner BB. On the removal of diffusable substances from the circulating blood by means of dialysis. Trans Assoc Am Physicians 1913;28:51.
5. Quinton WE, Dillard DH, Scribner BH. Cannulation of blood vessels for prolonged hemodialysis. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1960;6:104.
6. Boen ST, Mulinari AS, Dillar DH, Scribner BH. Periodic peritoneal dialysis in the management of chronic uraemia. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1962;8:256-62.
7. Lasker N, McCauley EP, Passeroti CT. Chronic peritoneal dialysis. Trails Am Soc Artif Intern Organs 1966;12:94-7.
8. Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD, Ghods AJ, Twardowski ZJ, Pyle WK. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. Ann Intern Med 1978;88:449-56.
9. Tenckhoff H, Schechter HA. Bacteriologically safe peritoneal access device. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1973;19:363-70.

10. Popovich RP, Moncrief JW, Decherd JB, Pyle WK. The definition of a novel portable-wearable equilibrium peritoneal technique. Am Soc Artif Intern Organs 1976;5:64-8.
11. Oreopulos DG, Robson M, Izatt G, Claiton S, De Veber GA. A simple and safe technique for continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). Trans Am Soc Artif Intern Organs 1978;24:484-9.
12. Diaz-Buxo JA, Walker PJ, Farmer CD, Chandler JT, Holt KL, Cox P. Continuous cyclic peritoneal dialysis: a viable option in the treatment of chronic renal failure. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1981;27:51-3.
13. Price CG, Suki WN. Newer modifications of peritoneal dialysis. Am J Nephrol 1981;2:97-104.
14. Zec J. Izbor dijalitičke metode u liječenju akutne i kronične renalne insuficijencije (disertacija). Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 1974.
15. Zec J, Tićac T, Zgrablić M, Aničić M, Gudović A, Frančišković V. Dvije i pol godine iskustva s redovitom hemodijalizom bolesnika od kronične renalne insuficijencije. Lijec Vjesn 1970;92:641.
16. Zec J, Čohar F, Ćuruvija D, Gržetić M, Matić-Glažar Đ, Orlić P, Razmilić D, Živčić S. Mijenjanje karakteristika bolesnika liječenih redovitom dijalizom. Acta Fac med Flum 1994;19:5-11.
17. Kessler M, Canaud B, Pedrini LA i sur. European Best Practice Guidelines for Haemodialysis (Part 1). Section 1: Measurement of renal function, when to refer and when to start dialysis. Nephrol Dial Transplant 2002; 17 Suppl 7:10-11.

18. Van Biesen W, Vanholder RC, Veys N, Dhondt A, Lameire NH. An evaluation of an integrative care approach for end-stage renal disease patients. J Am Soc Nephrol 2000; 11:116–25.
19. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. J Am Med Assoc 1956;160:277-82.
20. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. J Anat 1943;77:299.
21. Tilney NL, ur. Petar Medawar and transplantation biology. U: Transplant: from myth to reality. New Haven – London: Yale University Press; 2003, str. 109-24.
22. Hamburger J, Vaysse A, Crosnier J i sur. Transplantation d'un rein entre non-monozygotes après irradiation du recouver. Presse Med 1959;67:1771-5.
23. Merill JP, Murray JE, Takats F. Successful transplantation of kidney from a human cadaver. J Am Med Assoc 1963;185:347-53.
24. Starzl TE, Marchioro TL, Waddell WR. The reversal of rejection in human renal homografts with subsequent development of homograft tolerance. Surg Gynecol Obstet 1963;117:385-95.
25. Starzl TE, ur. A counterattack on rejection. U: The puzzle people: memoirs of a transplant surgeon. Pittsburgh: University of Pittsburgh Press; 2003, str. 132-44.
26. Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA, Iwatsuki S, Schröter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin A and prednisone. N Engl J Med 1981;305:266–9.
27. Canadian Multicentre Trial Group. A randomized clinical trial of cyclosporine in cadaveric renal transplantation. N Engl J Med 1983;309:809-15.

28. European Multicentre Trial Group. Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: one-year follow-up of a multicentre trial. Lancet 1983;2:986-9.

29. Frančišković V, Vlahović Š, Zec J, Orlić P, Peterković V. Transplantacija bubrega – prikaz jednog slučaja. Lijec Vjesn 1971;93:849-57.

30. Frančišković V, Čohar F, Gudović A i sur. Iskustva nakon 40 transplantacija bubrega Lijec Vjesn 1975;97:332.

31. Orlić P, Gržetić M, Fučkar Ž i sur. Transplantacija bubrega u KBC Rijeka. U: Dekaris D, Čulo F, ur. Klinička imunologija u nas. Zagreb: Naprijed; 1990, str.507-14.

32. Vujaklija-Stipanović K. Transplantacija bubrega: dodatni impuls riječkoj medicini. Acta Fac Med Flum 1994;19:79-82.

33. Orlić P, Petrošić N, Gržetić M, Fućak M, Zec J. Primarna afunkcija bubrega nakon transplantacije s kadavera. U: Drinovec J, Ponikvar R, ur. Nefrologija 1986. 3. kongres nefrologa Jugoslavije. Zbornik radova. Ljubljana: Udruženje nefrologa Jugoslavije; 1985, str. 512-4.

34. Frančišković V, Matić-Glažar Đ, Vukas D i sur. Imunosupresivno liječenje ciklosporinom u transplantaciji bubrega. Lijec Vjesn 1986;108:267-9.

35. Orlić P, Mozetič V, Živčić S i sur. Transplantacija bubrega u kliničko bolničkom centru u Rijeci. Acta Fac med Flum 1994;19:83-8.

36. Orlić P, Zelić M, Uravić M i sur. Transplantacija bubrega i gušterače – korak dalje u liječenju renalne insuficijencije uzrokovane dijabetičkom nefropatijom. Lijec Vjesn 1996;118 Suppl 2:195-7.

37. Orlić P, Zelić M, Uravić M i sur. Organ transplantation at the Rijeka Clinical medical centre – from kidney to pancreas. Acta Med Croat 1994;48 Suppl 1:1-5.

38. Orlić L, Sladoje-Martinović B, Matić-Glažar Đ, Orlić P, Maleta I, Vukas D. Kadaverična transplantacija bubrega u bolesnika starijih od 60 godina. Med Arh 2001;55 Suppl 4:209-10.

39. Transplantacijski program RH. Podaci Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH. *Dostupno na*: http://www.mzss.hr/hr/programi_i_projekti/unaprijedenje_zdravstvenih_usluga/transplantacijski_program; rujan 2009.

40. Podaci o transplantaciji organa. Hrvatska donorska mreža. *Dostpuno na:* http://www.hdm.hr/podaci-hr.html

41. Berthoux F, Abramowicz D, Bradley B i sur. European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (Part 2). Section IV: Long–term management of the transplant recipient. Nephrol Dial Transplant 2002;17 Suppl 4:23-4.

42. Didlake RH, Dreyfus K, Kerman RH, Van Buren CT, Kahan BD. Patients non-compliance - a major cause of late graft failure in cyclosporine treated renal transplants. Transplant Proc 1988;20:63-9.

43. EBPG Expert Group on Renal Transplantation. European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (Part 1). Section 1: Evaluation, selection and preparation of the potential transplant recipient. Nephrol Dial Transplant 2000;15 Suppl 7:3-38.

44. Hoitsma AJ, Hilbrands LB. Selection and preparation of the recipient. U: Davison A, Cameron JS, Grünfeld JP i sur., ur. Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford: Oxford University Press; 2005, str. 2039-48.

45. Ramos E, Weir MR, Klassen D, Keay S. Donor and recipient transplantation evaluation. U: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH, ur. Clinical

nephrology, dialysis and transplantation. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle; 2004, pogl. III.2, str. 1-26.

46. Bubić-Filipi Lj, Puretić Z, Kes P, Pasini J, Kerhin Brkljačić V, Živčić-Ćosić S i sur. Nacionalne smjernice za obradu, odabir i pripremu mogućih primatelja bubrežnog presatka 2005. Zagreb: Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi; 2006. *Dostupno na*: http://www.mzss.hr. Programi i projekti. Transplantacijski program. Dokumenti. Nacionalne smjernice za transplantaciju bubrega. Rujan, 2009.

47. Živčić-Ćosić S, Fucak M, Orlić P i sur. Ispitivanje i odabir kandidata za transplantaciju bubrega u kliničkom bolničkom centru Rijeka. Acta Med Croatica 2003;57:65-8.

48. Zakon o uzimanju i presađivanju dijelova ljudskog tijela u svrhu liječenja. Narodne novine RH 2004;177. *Dostupno na*: http://www.nn.hr. Službeni dio. Godina 2004, br. 177. Rujan, 2009.

49. Pravilnik o pobližim medicinskim kriterijima te načinu i postupku utvrđivanja smrti osobe kojoj se dijelovi tijela mogu uzimati radi presađivanja. Narodne novine RH 1991;53. *Dostupno na*: http://www.nn.hr. Službeni dio. Godina 1991, br. 53. 27. Zakon o preuzimanju saveznih zakona iz oblasti zdravstva koji se u Republici Hrvatskoj primjenjuju kao republički zakoni. Članak 1. Točka 2. Zakon o uvjetima za uzimanje i presađivanje dijelova ljudskog tijela ("Službeni list SFRJ", br. 63/90, 22/91). Rujan, 2009.

50. Stratta RJ. Expanded criteria donors in kidney transplantation: a treadmill or bandwagon effect? Medscape Transplantation 2004;5 © 2004 Medscape. *Dostupno na*: http://cme.medscape.com/viewarticle/488926. Rujan, 2009.

51. Kendrick E, Singer J, Gritsch HA, Rosenthal T. Medical and surgical aspects of kidney donation. U: Danovitch GM, ur. Handbook of Kidney Transplantation. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005; str. 161-2.

52. Bernat JL, D'Alessandro AM, Port FK i sur. Report of a National conference on Donation after cardiac death. Meeting Report. Am J Transplant 2006;6 Suppl 2:281-91.

53. Slapak M, Evans P, Tricket L i sur. Can AB0-incompatible donors be used in renal transplantation? Transplant Proc 1984;16:75-9.

54. Opelz G. A Collaborative Transplant Study. Newsletter 2. 1988. *Dostupno na*: http://www.ctstransplant.org/public/newsletters/1988/gif/1988-2.html?ts=806714295316713. Rujan, 2009.

55. Montgomery RA. AB0 incompatible, positive crossmatch, and paired kidney exchange transplantation. Medscape Transplantation 2004;5:1-7 © 2004 Medscape. *Dostupno na*: http://cme.medscape.com/viewarticle/470687_2. Rujan, 2009.

56. Tanabe K, Takahashi K, Sonda K i sur. Long-term results of AB0-incompatible living kidney transplantation: a single center experience. Transplantation 1998;65:224-8.

57. Nelson PW, Landreneau MD, Luger AM i sur. Ten-year experience in transplantation of A2 kidneys into B and 0 recipients. Transplantation 1998;65:256-60.

58. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. II. The origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity. Proc R Soc B 1954;143:58-80.

59. Terasaki PI, ur. Histocompatibility. U: History of Transplantation. Los Angeles: UCLA; 1991, str. 497-510.

60. Opelz G. HLA matching and cadaver kidney transplantation – Status 1984. Ulster Med J Suppl 1985;54:70-5.

61. Opelz G. Correlation of HLA matching with kidney graft survival in patients with or without cyclosporin A treatment. Transplantation 1985;40:240-3.

62. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature 1964;204:998-1000.

63. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SW. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 1985;314:67-73. *Dostupno na*: http://www.nature.com/nature/journal/v314/n6006/abs/314067a0.html. Rujan, 2009.

64. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, ur. Antigen presentation to T lymphocytes. U: Immunobiology. 6.izd. New York: Garland Science Publishing; 2005, str. 169-201.

65. Andreis I, Višnjić D. Imunološke laboratorijske metode. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str. 211-32.

66. Eurotransplant International Foundation. Eurotransplant Brochure. Leiden; 2009. *Dostupno na*: http://www.eurotransplant.nl/files/misc/ET_brochure_English.pdf. Rujan, 2009.

67. Banas B, Barat A, Mampaso F, Pérez de Lema G. The immune system. U: Banas B, Nutzenberger AM, Pérez de Lema G, ur. Renal transplant rejection. Bad Homburg: Hygieneplan Verlag; 2007, str.11.

68. Marušić M, Grčević D. Geni i antigeni tkivne podudarnosti. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str.105-22.

69. Suthanthiran M, Strom TB. The immunology of transplantation. U: Davison A, Cameron JS, Grünfeld JP i sur., ur. Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford: Oxford University Press; 2005, str.2049-59.

70. Lakkis FG, Saleem S, Pearson TC, Larsen CP. Transplantation Immunobiology. U: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH, ur. Clinical nephrology, dialysis and transplantation. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle; 2004, pogl.III.1, str.1-18.

71. Vella J. Transplantation Immunobiology. U: Post TW, ur. UpToDate 16.1. Waltham: UpToDate; 2008. *Dostupno na*: www.uptodate.com.

72. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, ur. Basic concepts in immunology. U:. Immunobiology. 6.izd. New York: Garland Science Publishing; 2005, str.1-35.

73. Taradi M. Pregled imunosti. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str.3-16.

74. Marušić M, Grčević D. Imunološko prepoznavanje – temelj imunoreakcije. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str.105-22.

75. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, ur. T-cell-mediated immunity. U: Immunobiology. 6.izd. New York: Garland Science Publishing; 2005, str.319-65.

76. Marušić M, Grčević D. Presađivanje tkiva i organa. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str.333-44.

77. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, ur. Antigen recognition by B-cell and T-cell receptors. U: Immunobiology. 6.izd. New York: Garland Science Publishing; 2005, str.103-134.

78. Čulo F, Batinić D. Organizacija imunosnoga sustava. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str.27-68.

79. Bonilla FA. The cellular immune response. U: Feldweg AM, ur. UpToDate 16.1. Waltham: UpToDate; 2008. *Dostupno na*: www.uptodate.com.

80. Marušić M, Grčević D. Fiziološki tijek imunoreakcije. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str.139-156.

81. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, ur. The humoral immune response. U: Immunobiology. 6.izd. New York: Garland Science Publishing; 2005, str.319-65.

82. Bonilla FA. The humoral immune response. U: Feldweg AM, ur. UpToDate 16.1. Waltham: UpToDate; 2008. *Dostupno na*: www.uptodate.com.

83. Taradi M. Humoralna imunost. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str.157-180.

84. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, ur. Autoimmunity and transplantation. U: Immunobiology. 6.izd. New York: Garland Science Publishing; 2005, str.557-612.

85. Čulo F, Višnjić D. Stanična imunost. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str.181-95.

86. Abramowicz D, Wissing KM, Broeders N. Immunosuppression for renal transplantation. U: Davison A, Cameron JS, Grünfeld JP i sur., ur. Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford: Oxford University Press; 2005, str.2060-72.

87. Lewis RM. Induction and maintenance immunosuppressive therapy in renal transplant recipients. U: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH, ur.

Clinical nephrology, dialysis and transplantation. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle; 2004, pogl.III.4, str.1-49.

88. Marušić M, Grčević D. Djelovanje na imunoreakciju. U: Andreis I, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004, str.345-55.

89. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, ur. Extrinsic regulation of unwanted immune responses. U: Immunobiology. 6.izd. New York: Garland Science Publishing; 2005, str.613-30.

90. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med 2004; 351:2715-29.

91. Quemeneur L, Flacher M, Gerland LM, French M, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Mycophenolic acid inhibitis IL-2-dependent T cell proliferation, but not IL-2-dependent survival and sensitization to apoptosis. J Immunol 2002;169:2747-55.

92. Vella J. Investigational immunosuppressive drugs and approaches in clinical kidney transplantation. U: Post TW, ur. UpToDate 16.1. Waltham: UpToDate; 2008. *Dostupno na*:
www.uptodate.com.

93. Goebel J, Stevens E, Forrest K, Roszman TL. Daclizumab (Zenapax^{R}) inhibits early interleukin-2 receptor signal transduction events. Transplant Immunol 2000;8:153-9.

94. Tkaczuk J, Milford E, Yu C i sur. Intracellular signaling consequences of anti-IL-2Rα blockade by daclizumab. Transplant Proc 2001;33:212-3.

95. Haba T, Uchida K, Katayama A i sur. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a chimeric interleukin-2 receptor monoclonal antibody, basiliximab, in renal

transplantation: A comparison between japanese and non-japanese patients. Transplant Proc 2001;33:3174-5.

96. Praditpornsilpa K, Avihingsanon Y, Kupatawintu P i sur. Monitoring of T-cell subsets in patients treated with anti-CD 25 antibody. Transplant Proc 2004;36 Suppl 2S:487S-91S.

97. Lin MZ, Ming A, Zhao M. Two-dose basiliximab compared with two-dose daclizumab in renal transplantation: a clinical study. Clin Transplant 2006;20:325-9.

98. Baan CC, van Riemsdijk-Overbeeke LC, Boelaars-van Haperen MJAM, IJzermans JMN, Weimar W. Inhibition of the IL-15 pathway in anti-CD25 mAb treated renal allograft recipients. Transplant Immunol 2002;10:81-7.

99. Snyder JT, Shen JJ, Azmi H, Hou J, Fowler DH, Ragheb JA. Direct inhibition of CD40L expression can contribute to the clinical efficacy of daclizumab independently on its effects on cell division and Th1/Th2 cytokine production. Blood 2007;109:5399-406.

100. Bingyi S, Ming C, Yeyong Q, Chunbai M, Wenqiang Z. The effect of anti-CD25 monoclonal antibody (Simulect) to the lymphocytes in the peripheral blood of the recipients of kidney transplantation. Transplant Proc 2003;35:243-5

101. Ter Meulen CG, Baan CC, Hene RJ i sur. Two doses of daclizumab are sufficient for prolonged interleukin-2R alpha chain blockade. Transplantation 2001;72:1709-10.

102. Soltero L, Carbajal H, Sarkissian N i sur. A truncated-dose regimen of daclizumab for prevention of acute rejection in kidney transplant recipients: a single-center experience. Transplantation 2004;78:1560-3.

103. Abramowicz D, Vanrenterghem Y, Squifflet JP i sur. Efficacy and cardiovascular safety of daclizumab, mycophenolate moffetil, tacrolimus, and early steroid withdrawal in renal transplant recipients: a multicenter, prospective, pilot trial. Clin Transplant 2005; 19:475-82.

104. Mayer AD, Dimitreski J, Squifflet P i sur. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. Transplantation 1997;64:436-42.

105. Pirsch JD. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. Transplantation 1997;63:977-83.

106. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. Lancet 1995;345:1321-5.

107. Sollinger HW for the US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate Mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. Transplantation 1996;60:225-32.

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

109. Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, Groth C, Hooftman L, Barker C. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The

International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups Transplantation 1997;63:39-47. *Ispravak rada u Transplantation 1997;63:618.*

110. Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA i sur. Mycophenolate mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. Transplantation 2000;69:2405-9.
111. Opelz G. Efficacy of rejection prophylaxis with OKT3 in renal transplantation. Collaborative Transplant Study (comments). Transplantation 1995;60:1220-4.
112. Ciancio G, Burke GW, Suzart K i sur. Daclizumab induction, tacrolimus, mycophenolate mofetil and steroids as an immunosuppression regimen for primary kidney transplant recipients. Transplantation 2002;73:1100-6.
113. Lebranchu Y, Bridoux F, Büchler M i sur. Immunoprophylaxis with basiliximab compared with antithymocyte globulin in renal transplant patients receiving MMF-containing triple therapy. Am J Transplant 2002;2:48-56.
114. Lawen JG, Davies EA, Mourad G i sur. Randomized double-blind study of immunoprophylaxis with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody, in combination with mycophenolate mofetil-containing triple therapy in renal transplantation. Transplantation 2003;75,37-43.
115. Hollander AA, van Saasse JL, Kootte AM i sur. Beneficial effects of conversion from cyclosporin to azathioprine after kidney transplantation. Lancet 1995;345:610-4.
116. MacPhee IA, Bradley JA, Briggs JD i sur. Long-term outcome of a prospective randomized trial of conversion from cyclosporine to azathioprine treatment one year after renal transplantation. Transplantation 1998;66:1186-92.
117. Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus

versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. Transplantation 1998;66:1736-40.

118. Opelz G. A Collaborative Transplant Study. Newsletter 3. 1998. *Dostupno na*: http://www.ctstransplant.org/public/newsletters/1998/gif/1988-3.html?ts=9764427646317070. Rujan, 2009.

119. Kasiske BL, Chakkera HA, Louis TA, Ma JZ. A meta-analysis of immunosuppression withdrawal trials in renal transplantation. J Am Soc Nephrol 2000;11:1910-7.

120. Abramowicz D, Manas D, Lao M i sur. Cyclosporine withdrawal from a mycophenolate mofetil-containing immunosuppressive regimen in stable kidney transplant recipients: a randomized, controlled study. Transplantation 2002;74:1725-34.

121. Brennan DC, Bohl D. Infectious complications in renal transplant recipients. U: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH, ur. Clinical nephrology, dialysis and transplantation. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle; 2004, pogl.III.6, str.1-34.

122. Goral S, Helderman JH. Non-infectious post-transplant complications. U: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH, ur. Clinical nephrology, dialysis and transplantation. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle; 2004, pogl. III.7, str.1-12.

123. Berthoux F, Abramowicz D, Bradley B i sur. European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (Part 2). Section IV: Long–term management of the transplant recipient. Nephrol Dial Transplant 2002;17 Suppl 4:3-67.

124. Schweizer RT, Rovelli M, Palmeri D, Vossler E, Hull D, Bartus S. Non-compliance in organ transplant recipients. Transplantation 1991;49:374-7.

125. Magee CC, Sayegh MM. Allograft dysfunction: differential diagnosis and management. U: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH, ur. Clinical nephrology, dialysis and transplantation. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle; 2004, pogl. III.5,str.1-36

126. Pham PTT, Pham PCT, Wilkinson AH. Management of the renal transplant recipient. The early management of the recipient. U: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP i sur., ur. Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford: Oxford University Press; 2005, str.2087-101.

127. Vella J, Koch MJ, Brennan DC. Acute renal allograft rejection: diagnosis. U: Post TW, ur. UpToDate 16.1. Waltham: UpToDate; 2008. *Dostupno na*: www.uptodate.com.

128. EBPG Expert Group on Renal Transplantation. European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (Part 1). Section III: The transplant recipient from initial transplant hospitalization to 1 year post-transplant. III.9 Rejection: diagnosis and treatment. Nephrol Dial Transplant 2000; 15 Suppl 7:77-83.

129. Ortho Multicentre Transplant Study Group. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. N Engl J Med 1985;313:337-42.

130. Kamath S, Dean D, Peddi VR i sur. Efficacy of OKT3 as primary therapy for histologically confirmed acute renal allofgraft rejection. Transplantation 1997;64:1428-32.

131. Webster AC, Pankhurst T, Rinaldi F i sur. Monoclonal and polyclonal antibody therapy for treating acute rejection in kidney transplant recipients: A Systematic Review of Randomized Trial Data. Transplantation 2006;81:953.

132. Adis International Limited. ISA 247: trans-ISA 247, trans-R 1524, ISA(TX)247, ISAtx 247, ISATx247, LX 211, LX211, R 1524, R-1524. Drugs R D 2007;8:103-12.

133. Budde K, Schütz M, Glander P i sur. FTY720 (fingolimod) in renal transplantation. Clin Transplant 2006;20 Suppl 17:17-24.

134. Williams JW, Mital D, Chong A i sur. Experiences with leflunomide in solid organ transplantation. Transplantation 2002;73:358–66.

135. Blanckaert K, De Vriese AS. Current recommendations for diagnosis and management of polyoma BK virus nephropathy in renal transplant recipients. Nephrol Dial Transplant 2006;21:3364-7.

136. Astellas Pharma Inc. Astellas discontinues development of immunosuppressant FK778. Tokyo 2006. Dostupno na: http://www.japancorp.net/Article.Asp?Art_ID=12810. Rujan, 2009.

137. Vincenti F. Current Use and Future Trends in Induction Therapy. Saudi J Kidney Dis Transpl 2005;16:506-13.

138. Baan C, Weimar W. Targeting the IL-15 pathway to prevent rejection after organ transplantation. Transplant Rev 2006;20:28-33.

139. Vincenti F, Kirk AD. What's new in the pipeline? Am J Transplant 2008;8:1972-81.

140. Kirk AD, Knechtle SJ, Sollinger HW, Vincenti FG, Stecher S, Nadeau K. Preliminary results of the use of humanized anti-CD154 in human renal allotransplantation. Am J Transplant 2001;1 Suppl 1:191.

141. Hitt E. Efalizumab withdrawn from US market. Medscape Medical News © 2009 Medscape, LLC. *Dostupno na*: http://www.medscape.com/viewarticle/590862. Rujan, 2009.

142. Van Gurp EA, Schoordijk-Verschoor W, Klepper M i sur. The effect of the JAK inhibitor CP-690,550 on peripheral immune parameters in stable kidney allograft patients. Transplantation 2009;87:79-86.

143. Busque S, Leventhal JB, Brennan DC i sur. Calcineurin-inhibitor-free immunosuppression based on the JAK inhibitor CP-690,550: a pilot study in de novo kidney allograft recipients. Am J Transplant 2009;9:1936-45.

144. West K. CP-690550, a JAK3 inhibitor as an immunosuppressant for the treatment of rheumatoid arthritis, transplant rejection, psoriasis and other immune-mediated disorders. Curr Opin Investig Drugs 2009;10:491-504.

145. Evenou JP, Wagner J, Zenke G i sur. The potent protein kinase C selective inhibitor AEB071 (Sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T cell activation. JPET Fast Forward 2009. *Dostupno na*: http://jpet.aspetjournals.org/cgi/reprint/jpet.109.153205v1.pdf. Rujan, 2009.

146. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A i sur. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. N Engl J Med 2005;353:770-81.

147. Belatacept evaluation of nephroprotection and efficacy as first-line immunosuppression (BENEFIT). Treća faza kliničkog ispitivanja. Bristol-Myers Squibb, SAD. *Dostupno na* http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00256750. Rujan, 2009.

148. Study of belatacept in subjects who are undergoing a renal transplant (BENEFIT-EXT). Treća faza kliničkog ispitivanja. Bristol-Myers Squibb, SAD. *Dostupno na*: http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00114777. Rujan, 2009.

149. A study to assess the safety and efficacy of alefacept in kidney transplant recipients. Treća faza kliničkog ispitivanja. Astellas-Pharma Inc., USA. *Dostupno na*:

http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00543569. Rujan, 2009.

150. Pham PT, Lipshutz GS, Pham PT, Kawahji J, Singer JS, Pham PT. The evolving role of alemtuzumab (Campath-1H) in renal transplantation. Drug Des Devel Ther 2009;3:41–9

151. Morales J, Bono MR, Fierro R i sur. Alemtuzumab induction in kidney transplantation: clinical results and impact on T-regulatory cells. Tranplant Proc 2008;40:3223-8.

152. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M i sur. Rituximab and intravenous immune globulin for desenzitization during renal transplantation. N Engl J Med 2008;359:242-51.

153. Buhaescu I, Segall L, Goldsmith D, Covic A. New immunosuppressive therapies in renal transplantation: monoclonal antibodies. J Nephrol 2005;18:529-36.

154. Silva HM, Vieira PMMM, Costa PLN i sur. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. Immunol Lett 2009;125:129-36.

155. Thomas HW, Thompson JS, Siemionow M, Brown SA. T10B9 monoclonal antibody: a short-acting nonstimulating monoclonal antibody that spares γδ T-cells and treats and prevents cellular rejection. Drug Des Devel Ther 2009. *Dostupno na*: http://www.dovepress.com/t10b9-monoclonal-antibody-a-short-acting-nonstimulating-monoclonal-ant-peer-reviewed-article. Rujan, 2009.

156. Fourtounas C, Mouzaki A, Vlachojannis JG. Desenzitization during renal transplantation. N Engl J Med 2008;359:1731-2.

157. Everly MJ, Everly JJ, Susskind B i sur. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. Transplantation 2008;86:1754-61.

158. Xu H, He X, Liu Q i sur. The abnormal high expression of B Cell activating factor belonging to TNF superfamily (BAFF) and its potential role in kidney transplant recipients. Cell Mol Immunol 2008;5:465-70.

159. Panzer U, Ranking RR, Steinmetz OM i sur. CXCR3 and CCR5 positive T-cell recruitment in acute human renal allograft rejection. Transplantation 2004;78:1341-50.

160. Schnickel GT, Bastani S, Hsieh GR i sur. Combined CXCR3/CCR5 Blockade Attenuates Acute and Chronic Rejection. J Immunol 2008;180:4714-21.

161. Genberg H, Kumlien G, Shanwell A, Tydén G. Refractory acute renal allograft rejection successfully treated with photopheresis. Transplant Proc 2005;37:3288-9.

162. Bluestone JA, Liu W, Yabu JM i sur. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. Am J Transpl 2008;8: 2086-96.

163. Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. Nat Rev Immunol 2003;3:189-98.

164. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. Nat Rev Immunol 2003;3:199-210.

165. Bluestone JA. Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? Nat Rev Immunol 2005;5:343-9.

166. Marti HP, Henschkowski J, Laux G i sur. Effect of donor-specific transfusions on the outcome of renal allografts in the cyclosporine era. Transplant Int 2006;19:19-26.

167. Ciancio G. Donor bone marrow infusion in cadaveric renal transplantation. Transplant Proc 2003;35:871-2.

168. Guenther DA, Madsen JS. Advances in strategies for inducing central tolerance in organ allograft recipients. Pediatr Transplant 2005;9:277-81.

169. Cascalho M, Platt JL. The future of organ replacement: needs, potential applications, and obstacles to application. Transplant Proc 2006;38:362-4.

170. Valdés-González RA, Dorantes LM, Garibay GN. Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. Eur J Endocrinol 2005;153:419-27.

171. Blancho G. Editorial xenotranpslantation. Curr Opin Organ Transplant 2009;14:147.

172. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. Am J Transplant 2004;4:378-83

173. Amend WJC, Vincenti F, Tomlanovich SJ. The first three posttransplant months. U: Danovitch GM, ur. Handbook of kidney transplantation. 4.izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005,str.212-33.

174. Nicholson M. Management of the renal transplant recipient. Surgery and surgical complications. U: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP i sur., ur. Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford: Oxford University Press; 2005,str.2073-87.

175. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976;16:31-41.

176. Zimmerman P, Ragavendra N, Schiepers C. Diagnostic imaging in kidney transplantation. U: Danovitch GM, ur. Handbook of kidney transplantation. 4.izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005,str.347-68.

177. Mozetič V, Fučkar Ž. Sonografija u transplantaciji bubrega. U: Šustić A, Miletić C, Mozetič V, ur. Sonografija urogenitalnog sustava. I. dio. Rijeka: Digital Point; 1998,str. 241-9.

178. Mozetič V. Uloga indeksa otpora u kolor Doppler praćenju perfuzije transplantata bubrega (magisterij). Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 1996.

179. Smokvina A, Burić A, Orlić P. Prospective evaluation of renal allograft dysfunction with 99m technetium mercaptoacetyltriglycine dynamic renal imaging. Period biol 1989;91:437-8.

180. Hilson AJW, Maisey MN, Brown CB, Ogg CS, Bewick MS. Dynamic renal transplant imaging with Tc-99m DTPA (Sn) supplemented by a transplant perfusion index in the management of renal transplants. J Nucl Med 1978;19:994-1000.

181. Smokvina A. Doprinos dinamičkih ispitivanja radionuklidima u ocjeni perfuzije transplantiranog bubrega (doktorska disertacija). Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 1994, str.117.

182. Smokvina A. The renal transplant perfusion index: Importance of the arterial and renal curves. Time shift correction. Eur J Nucl Med 1996.

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

184. Montgomery RA, Hardy MA, Jordan SC i sur. Consensus opinion from the antibody working group on the diagnosis, reporting, and risk assessment for

antibody-mediated rejection and desensitization protocols. Transplantation 2004;78:181-5.

185. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S i sur. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. Am J Tranplant 2004;4:1033-41.

186. Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. Am J Transplant 2006;6:2006-12.

187. Seron D, Moreso F. Protocol biopsies in renal transplantation: Prognostic value of structural monitoring. Kidney Int 2007;72:690-7.

188. Mengel M, Chapman JR, Cosio FG i sur. Protocol biopsies in renal transplantation: insights into patient management and pathogenesis. Am J Transplant 2007;7:512-7.

189. Colvin RB. Eye of the needle. Am J Transplant 2007;7:267-8.

190. Campbell PM. Pathology of acute rejection in the renal allograft. ASHI quaterly. Third quarter 2004. 86. Scientific communications.

191. Süsal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. Transplantation 2002;73:1269-73.

192. Süsal C, Opelz G. Good kidney transplant outcome in recipients with presensitization against HLA class II but not HLA class I. Hum Immunol 2004;65:810-6.

193. Opelz G. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. Lancet 2005;365:1570-6.

194. Mizutani K, Terasaki P, Rosen A i sur. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. Am J Transplant 2005;5:2265-72.

195. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. N Engl J Med 2007;357:1293-1300.

196. Quiroga I, Salio M, Koo DD i sur. Expression of MHC class I-related chain B (MICB) molecules on renal transplant biopsies. Transplantation 2006;81:1196-203.

197. Sumitran-Holgersson S. Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation. Curr Opin Immunol 2008;20:607-13.

198. Dragun D, Hegner B. Non-HLA antibodies post-transplantation: clinical relevance and treatment in solid organ transplantation. U: Remuzzi G, Chiaramonte S, Perico N, Ronco C, ur. Humoral immunity in kidney transplantation. Contrib Nephrol. Basel: Karger; 2009;162:129-39.

199. Süsal C, Döhler B, Opelz G. Graft-protective role of high pretransplantation IgA-anti-Fab autoantibodies: confirmatory evidence obtained in more than 4000 kidney transplants. Transplantation 2000;69:1337-40.

200. Pelzl S, Opelz G, Daniel V, Wiesel M, Süsal C. Evaluation of postransplant soluble CD30 for diagnosis of acute renal allograft rejection. Transplantation 2003;75:421-3.

201. Khazen, Jendoubi-Ayed S, Gorgi Y i sur. Adhesion molecule polymorphisms in acute renal allograft rejection. Transplant Proc 2007;39:2563-4.

202. Mehta R, Shah G, Adler W, Kittur D. Soluble interleukin 2 receptor (sIL-2R) levels in renal transplant recipients. Clin transplant 2004;18 Suppl 12:67-71.

203. Weimer R, Süsal C, Yildiz S i sur. Post-transplant sCD30 and neopterin as predictors of chronic allograft nephropathy: impact of different immunosuppressive regimens. Am J Transplant 2006;6:1865-74.

204. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. J Immunol 1994;152:5120-7.

205. Li B, Hartono C, Ding R i sur. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. N Engl J Med 2001;344:947-54.

206. Netto M. Granzyme B, fas-ligand and perforin expression during acute cellular rejection episodes after kidney transplantation: comparison between blood and renal aspirates. Transplant Proc 2002;34:476-8.

207. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M i sur. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:695-700.

208. Desveaux D, Schwarzinger M, Pastural M i sur. Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: Correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. Transplantation 2004;78:647-53.

209. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R i sur. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. N Engl J Med 2005;353:2342-51.

210. Zhang GY, Hu M, Wang YM, Alexander SI. Foxp3 as a marker of tolerance induction versus rejection. Curr Opin Organ Transplant 2009;14:40-5.

211. Ashton-Chess J, Giral M, Mengel M i sur. Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection. J Am Soc Nephrol 2008;19:1116-27.

212. Stassen PM, Derks RP, Kallenberg CG, Stegeman CA. Thiopurinemethyltransferase (TPMT) genotype and TPMT activity in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: relation to azathioprine maintenance treatment and adverse effects. Ann Rheum Dis 2009;68:758-9.

213. Baldelli S, Merlini S, Perico N i sur. C-440T/T-331C polymorphisms in the UGT1A9 gene affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation. Pharmacogenomics 2007;8:1127-41.

214. Smith HE, Jones JP, Kalhorn TF i sur. Role of cytochrome P450 2C8 and 2J2 genotypes in calcineurin inhibitor-induced chronic kidney disease. Pharmacogenet Genomics 2008;18:943-53.

215. Kurian S, Grigoryev Y, Head S, Campbell D, Mondala T, Salomon DR. Applying genomics to organ transplantation medicine in both discovery and validation of biomarkers. Int Immunopharmacol 2007;7:1948-60.

216. Schaub S, Wilkins JA, Nickerson P. Proteomics and renal transplantation: searching for novel biomarkers and therapeutic targets. U: Thongboonkerd V, ur. Proteomics in Nephrology – Towards clinical applications. Contrib Nephrol. Basel: Karger 2008;160: 65-75.

217. Sigdel TK, Lau K, Schilling J, Sarwal M. Optimizing protein recovery for urinary proteomics, a tool to monitor renal transplantation. Clin Transplant 2008;22: 617-23.

218. Mao Y, Bai J, Chen J i sur. A pilot study of GC/MS-based serum metabolic profiling of acute rejection in renal transplantation. Transpl Immunol 2008;19:74-80.

219. Wishart D. Metabolomics: A Complementary Tool in Renal Transplantation. U: Thongboonkerd V, ur. Proteomics in Nephrology – Towards clinical applications. Contrib Nephrol. Basel: Karger; 2008;160:76-87.

220. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, ur. The cell cycle. U: Molecular biology of the cell. 5. izd. New York: Garland Science 2008, str.1053-114.

221. Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. Science 1996;274(5293):1643-5.

222. Stillman B. Cell cycle control of DNA replication. Science 1996;274(5293):1659-64.

223. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science 1996;274 (5293):1664-72.

224. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. Bioessays 1995;17:471–80.

225. Mitchell RN, Cotran RS. Tissue repair: cell regeneration and fibrosis. U: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, ur. Robbins basic pathology. 7. Izd. Philadelphia: Saunders; 2004, str. 61-78.

226. Norbury C. Cdc2 protein kinase (vertebrates). U: Hardie DG, Hanks S, ur. Protein kinase factsbook. Boston: Academic Press; 1995, str.184.

227. Denicourt C, Dowdy SF. Cip/kip proteins: more than just cdks inhibitors. Genes Dev 2004;23:851-5.

228. Sharpless NE, DePinho RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. Curr Opin Genet Dev 1999;9:22-30.

229. Orlić P, Dvornik Š, Husnjak SC, Aralica M, Orlić L, Živčić-Ćosić S i sur. pp65 antigenemija u praćenju citomegalovirusne infekcije nakon transplantacije bubrega. Acta med Croatica 2003;57:49-52.

230. Živčić-Ćosić S, Gržetić M, Valenčić M i sur. Urothelial cancer in patients with endemic Balkan nephropathy (EN) after renal transplantation. Ren Fail 2007;29:861-5.

231. Reichert T, DeBruyere M., Deneys V i sur. Lymphocyte subset reference ranges in adult caucasians. Clin Immunol Immunopathol 1991;60:190-208.

232. Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju. Hrvastki registar nadomještanja bubrežne funkcije, izvještaj za 2005.g. *Dostupno na:* http://www.hdndt.org/registar-forward-2005.htm. Rujan, 2009.

233. ERA-EDTA. Annual Report 2007. *Dostupno na:* http://www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2007.pdf. Rujan, 2009.

234. Eurotransplant International Foundation. Annual Report 2008. *Dostupno na:* www.eurotransplant.nl. Rujan, 2009.

235. UNOS Report 2009. *Dostupno na:* http://www.unos.org/data/. Rujan, 2009.

236. Scandiatransplant. Transplantation and waiting list figures 1. Quarter 2009. *Dostupno na:* www.scandiatransplant.org/. Rujan, 2009.

237. Collaborative transplant study. Outcome graphs. *Dostupno na:* www.ctstransplant.org. Rujan, 2009.

238. Cecka JM. The UNOS Scientific renal transplant registry. Cecka JM, Terasaki PM, ur. U: Clinical Transplants. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory 1998, str. 1-16.

239. Junor B. Outcome of renal transplantation. U: Davison A, Cameron JS, Grünfeld JP i sur., ur. Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford: Oxford University Press; 2005, str. 2129-37.

240. Opelz G, Döhler B. Effect on kidney graft survival of reducing or discontinuing maintenance immunosuppression after the first year posttransplant. Transplantation 2008;86:371-6.

241. Opelz G. Cadaver kidney graft outcome in relation to ischemia time and HLA match. Transplant Proc 1998;30:4294-6.

242. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Waiting time on dialysis as the strongest modifiable risk factor for renal transplant outcomes: a paired donor kidney analysis. Transplantation 2002;74:1377-81.

243. Van Dijk PC, Jager KJ, de Charro F, Collart F, Cornet R, Dekker FW. Renal replacement therapy in Europe: the results of a collaborative effort by the ERA-EDTA registry and six national or regional registries. Nephrol Dial Transplant 2001;16:1120-9.

244. Opelz G, Mickey MR, Terasaki PI. Calculations on long-term graft and patient survival in human kidney transplantation. Transplant Proc 1977;9:27-30.

245. Hariharan S, McBride M,Cherikh W i sur. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. Kidney Int 2002;62:311-8.

246. Maraha B, Bonten H, van Hooff H, Fiolet H, Buiting AG, Stobberingh EE. Infectious complications and antibiotic use in renal transplant recipients during a 1-year follow-up. Clin Microbiol Infect 2001;7:619-25.

247. Gill JS, Abichandani R, Kausz AT, Pereira BJ. Mortality after kidney transplant failure: the impact of non-immunologic factors. Kidney Int 2002;62:1875-83.

248. Briggs JD. Causes of death after renal transplantation. Nephrol Dial Transplant 2001;16:1545-9.

249. Farrugia E, Schwab TR. Management and prevention of cytomegalovirus infection after renal transplantation. Mayo Clin Proc 1992;67:879-90.

250. Sia IG, Patel R. New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. Clin Microbiol Rev 2000;13:83-121.

251. Paul LC, Benediktsson H. Chronic transplant rejection: magnitude of the problem and pathogenetic mechanisms. Transplant Rev 1993;7:96-104.

252. Opelz G. Effect of immunosuppressive therapy on graft half-life projections. Transplant Proc 1999;31 Suppl 7A:31S-33S.

253. Sahadevan M, Kasiske BL. Long-term posttransplant management and complications. U: Danovitch GM, ur. Handbook of kidney transplantation. 4.izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005,str.234-78.

254. Penn I. Malignancies associated with renal transplantation. Urology 1977;10:57-63.

255. Penn I. Second malignant neoplasms associated with immunosuppressive medications. Cancer 1976;37:1024-32.

256. Morath C, Mueller M, Goldschmidt H, Schwenger V, Opelz G, Zeier M. Malignancy in renal transplantation. J Am Soc Nephrol 2004;15:1582-8.

257. Feng S, Buell JF, Chari R i sur. Tumors and transplantation: the 2003 third annual ASTS state of the art winter symposium. Am J Transplant 2003;3:1481-7.

258. Grollman AP. Evidence for the role of aristolochic acid in endemic (Balkan) nephropathy. Coll Antropol 2006;30 Suppl 1:23.

259. Jelaković B. Endemic (Balkan) nephropathy and aristolochic acid. Lessons from Croatia. Coll Antropol 2006;30 Suppl 1:31.

260. Nortier JL, Vanherweghem JL. Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (Aristolochia fangchi). Toxicol 2002;181:577-80.

261. Chiang YJ, Chu SH, Liu KL, Lai WJ, Wang HH. Silent urothelial cancer detected by sonography after renal transplantation. Transplant Proc 2006;38:2084-5.

262. Hall BM, Dorsch S, Roser B. The cellular basis of allograft rejection in vivo. I. The cellular requirements for first-set rejection of heart grafts. J Exp Med 1978;148:878-89.

263. Pederson NC, Morris B. The role of humoral antibody in the rejection of primary renal allografts in sheep. J Exp Med 1974;140:619-30.

264. Habitcht S, Sayegh M. T cell costimulatory pathways. Curr Opin Organ Transplant 2008;13:17-22.

265. Pearce NW, Spinelli A, Gurley KE i sur. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporin V. Dependence of the $CD4^+$ supressor cell on the presence of alloantigen and cytokines, including interleukin-2. Transplantation 1993;55:374-80.

266. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing $CD25^+CD4^+$ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol 2005;6:345-52.

267. Hall BM, Robinson CM, Plain KM i sur. Studies on naive $CD4^+$ $CD25^+$ T cells inhibition of naive $CD4^+$ $CD25^-$ T cells in mixed lymphocyte cultures. Transpl Immunol 2008;18:291-301.

268. Verma N, Plain K, Nomura M i sur. $CD4^+$ $CD25^+$ T cells alloactivated ex vivo by IL-2 or IL-4 become potent alloantigen specific inhibitors of rejection with different phenotypes, suggesting Th1 and Th2 responses activate by separate pathways. Blood 2009;113:479-87.

269. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W i sur. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. Immunity 2004;21:589-601.

270. Rostaig L, Cantarovich D, Mourad G i sur. Corticosteroid-free immunosuppression with tacrolimus, mycophenolate mofetil,and daclizumab induction in renal transplantation. Transplantation 2005;79:807-14.

271. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A. i sur. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. N Engl J Med 2007;357:2625-7.

272. Büchler M, Caillard S, Barbier S i sur. Sirolimus versus cyclosporine in kidney recipients receiving Thymoglobulin®, Mycophenolate mofetil and a 6-month course of ateroids. Am J Transplant 2007;7:2522-7.

273. Orlić P, Živčić-Ćosić S, Orlić L, Sladoje-Martinović B, Prodan-Merlak Ž, Vuksanović-Mikuličić S. Primjena blokatora receptora za interleukin-2 u transplantaciji bubrega. Acta Med Croatica: 2005;59:118.

274. Wiland AM, Fink JC, Weir MR i sur. Should living-unrelated renal transplant recipients receive antibody induction? Results of a clinical experience trial. Transplantation 2004;77:422.

275. Cohen DJ, St. Martin L, Christensen LL i sur. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1995-2004. Am J Transplant 2005;6:843-5.

POPIS SKRAĆENICA

ADCC	stanicama posredovana citotoksičnost ovisna o protutijelima, prema engl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
ALG	antilimfocitni globulini
CAPD	kontinuirana ambulatorna peritonejska dijaliza, prema engl. continuous ambulatory peritoneal dialysis
CCPD	kontinuirana ciklička peritonejska dijaliza, prema engl. continuous cycling peritoneal dialysis
CD	razred razlikovanja, prema engl. cluster of differentiation
CDKs	ciklin-ovisne kinaze, prema engl. cyclin-dependent kinases
CML	stanicama posredovana limfoliza, prema engl. cell-mediated lympholysis
CMV	citomegalovirus
CMVIG	citomegalovirusni hiperimunosni globulin
CTLA4	citotoksični T-limfocitni antigen 4, prema engl. cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CTS	Collaborative Transplant Study
DACD	darivanje bubrega nakon srčane smrti, prema engl. donation after cardiac death
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DTPA	dietilentriaminopentaoctena kiselina
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina
ERA-EDTA	Europsko društvo za dijalizu i transplantaciju, engl. European Renal Association- European Dialysis and Transplant Association
ELISA	enzyme-linked immunoassay
EMIT	enzyme-multiplied immunoassay technique
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fas-L	Fas-ligand, CD178
FCS	serum telećeg fetusa, prema engl. fetal calf serum
FKBP	vezna bjelančevina za FK, prema engl. FK binding protein
Foxp3	forkhead box protein 3
FPIA	fluorescence polarization immunoassay
GREs	elementi glukokortikoidnog odgovora, prema engl. glucocorticoid response elements
HAMA	ljudska anti-mišja protutijela, prema engl. human anti-mouse antibodies
HLA	humani leukocitni antigeni
HPLC	high performance liquid chromatography
HUS	hemolitičko-uremijski sindrom
ICAM	intercellular adhesion molecule
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	interleukin 2 receptor, CD25, Tac
IMPDH	inozin monofosfat dehidrogenaza
INF-γ	interferon gama
INK4a/ARF	inhibitor of kinase 4a/alternative reading frame

IP3	inozitol-trifosfat
IVIG	intravenski imunoglobulini
JAK	Janus kinaza
JAK/STAT	Janus kinases/signal transducers and activators of transcription
LFA	lymphocyte function-associated antigen
MAC	kompleks koji napada membranu, prema engl. membrane attacking complex
MAG-3	merkaptoacetiltriglicin
MAP kinaze	mitogenom aktivirane protein kinaze
MDR protein	multidrug resistance protein
MEIA	microparticle enzyme immunoassay
MFK	mikofenolna kiselina
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti, prema engl. major histocompatibility complex
MICA	major histocompatibility complex class I-related chain A
MICB	major histocompatibility complex class I-related chain B
MLR	reakcija pomiješanih limfocita, prema engl. mixed lymphocyte reaction
MMF	mikofenolat mofetil
mRNK	glasnička ribonukleinska kiselina, prema engl. messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF	jezgrin čimbenik, prema engl. nuclear factor
NFAT	jezgrin čimbenik aktiviranih limfocita T, prema engl. nuclear factor of activated T cells
NHBD	darivatelj s nekucajućim srcem, prema engl. non-heart-beating donor
NK stanice	stanice prirodne ubojice, prema engl. natural killer cells
OKT3	Orthoclone T3
PBS	fosfatom puferirana fiziološka otopina, prema engl. phosphate buffered saline
PCR	lančana reakcija polimeraze, prema engl. polymerase chain reaction
PI	pulzatilni indeks, prema engl. pulsatility indeks
PKC	protein kinaza C
PIP_2	fosfatidilinozitol-bifosfat
PRA	panel-reaktivna protutijela, prema engl. panel reactive antibodies
PSV	najveća sistolička brzina, prema engl. peak systolic velocity
RAD	derivat rapamicina, prema engl. rapamycine-derivative
RI	indeks otpora, prema engl. resistive indeks
RNK	ribonukleinska kiselina
Rpm	okretaja u minuti, prema engl. rounds per minute
RPMI medij	Royal park memorial institute medij
Tac	T activation antigen, IL-2R, CD25
TGF-β	čimbenik transformacije rasta ß, prema engl. transforming growth factor-β
Th	pomoćnički limfociti T, prema engl. T helper
TNF	čimbenik tumorske nekroze, prema engl. tumor necrosis factor
TOR	cilj rapamicina, prema engl. target of rapamycin
TPP	trombotička trombocitopenična purpura
VLA4	very late antigen 4
ZAP-70	ζ-vezana bjelančevina, prema engl. zeta associated protein

ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime:	**Stela Živčić-Ćosić**
Adresa:	Turanski put 21, 51000 Rijeka
Telefonski broj:	051/621-749
Elektronska pošta:	stela.zivcic-cosic@ri.t-com.hr
Državljanstvo:	Hrvatsko
Datum i mjesto rođenja:	17. rujna 1966. u Rijeci
Matični broj iz Upisnika znanstvenika:	237970

Radno iskustvo

Datum:	1992. - danas
Naziv radnog mjesta:	odjelni liječnik Zavoda za nefrologiju i dijalizu Klinike za internu medicinu
Ustanova zaposlenja:	Klinički bolnički centar Rijeka
Datum:	1991.-1992.
Naziv radnog mjesta:	liječnik opće medicine
Ustanova zaposlenja:	Interdial Neptun -Centar za turističku hemodijalizu Opatija
Datum:	1990.-1991.
Naziv radnog mjesta:	liječnik opće medicine, Hitna medicinska pomoć
Ustanova zaposlenja:	Dom zdravlja Rab
Datum:	1989.-1990.
Naziv radnog mjesta:	liječnik pripravnik
Ustanova zaposlenja:	Klinički bolnički centar Rijeka

Školovanje

Datum:	2001.-2003.
Uža specijalizacija:	Nefrologija
Ustanova:	Klinički bolnički centar Rijeka
Datum:	1994.-1998.
Specijalizacija:	Interna medicina
Ustanova:	Klinički bolnički centar Rijeka
Datum:	1988.-1990.
Poslijediplomski studij:	Klinička patofiziologija
Zvanje:	Magistar znanosti iz područja biomedicine i zdravstva
Ustanova:	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Datum:	1983.-1988.
Studij:	Opća medicina
Ustanova:	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Datum:	1976.-1983.
Gimnazija:	Katharinengymnasium
Mjesto:	Ingolstadt, Njemačka
Datum:	1972.-1976.
Osnovna škola:	St.Pius Grundschule
Mjesto:	Ingolstadt, Njemačka
Datum:	1972.-1983.
Dopunska škola:	Nacionalna skupina predmeta (na materinskom jeziku)
Mjesto:	Ingolstadt, Njemačka
Datum:	2002.

Usavršavanje

Naziv:	Budapest Nephrology School
Mjesto:	Budimpešta, Mađarska
Datum:	2001.
Naziv:	Dialysis Academy
Mjesto:	Heidelberg, Njemačka
Datum:	2000.
Naziv:	Transplant Procurement Management Course
Mjesto:	Barcelona, Španjolska
Datum:	1999./2000.
Naziv:	European College of Transplantation
Mjesto:	Madrid, Španjolska i Lyon, Francuska
Datum:	1996.
Naziv:	Nefrologija, dijaliza, transplantacija bubrega i gušterače
Mjesto:	Klinikum Grosshadern, Muenchen, Njemačka
Datum:	1993.
Naziv:	Peritonejska dijaliza
Mjesto:	Staedtisches Krankenhaus, Muenchen, Njemačka
Datum:	1992.
Naziv:	Praktični tretman bubrežne insuficijencije
Mjesto:	Portsmouth, Engleska
Datum:	1987.
Naziv:	Tečaj reanimacije
Mjesto:	Klinički bolnički centar Rijeka

Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik: **Hrvatski**

Drugi jezici: **Njemački, engleski, talijanski i francuski jezik**

Organizacijske vještine i kompetencije:

- sudjelovanje u organizaciji II. Hrvatskog simpozija o
- supstitucijskom liječenju renalne insuficijencije i
- transplantacijskoj medicini, 1996., Rijeka
- član Nacionalne radne skupine za transplantaciju bubrega, Ministarstvo socijalne skrbi RH
- klinički koordinator za transplantaciju, revizija liste čekanja za transplantaciju bubrega

Tehničke vještine i kompetencije:

- rad na elektroničkom računalu
- uvođenje nove metode liječenja: automatizirana peritonejska dijaliza

Umjetničke vještine i kompetencije: električne orgulje, Muzička škola 1972.-1983.

Dodatni podatci: vozačka dozvola B kategorije

Publikacije

1. Kvalifikacijski rad
2. Znanstveni radovi
3. Stručni radovi
4. Druge publikacije
5. Kongresna priopćenja i izlaganja na stručnim skupovima

1. Kvalifikacijski rad

1. Živčić-Ćosić S. Promjene tjelesne težine kod bolesnika s kroničnim terminalnim bubrežnim zatajenjem na početku liječenja kroničnom hemodijalizom. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 1998. (Magistarski rad).

2. Znanstveni radovi

1. Živčić-Ćosić S, Gržetić M, Valenčić M, Oguić R, Maričić A, Djordjević G, Balen S, Orlić L, Rački S, Fučkar Ž. Urothelial cancer in patients with endemic balkan nephropathy (EN) after renal transplantation. Ren Fail. 2007; 29 (7): 861-865. (CC)
2. Orlić P, Živčić-Ćosić S, Orlić L, Sladoje-Martinović B, Prodan-Merlak Ž, Vuksanović-Mikuličić S. Primjena blokatora receptora za interleukin-2 u transplantaciji bubrega, Acta Med Croatica. 2005;59(2): 118.
3. Gržetić M, Rački S, Prodan-Merlak Ž, Vuksanović-Mikuličić S, Živčić-Ćosić S. Vrijednost citologije sedimenta urina u evaluaciji akutne tubularne nekroze nakon transplantacije bubrega, Acta Med Croatica. 2004;58(1): 19-23.

4. Rački S, Gržetic M, Prodan-Merlak Ž, Vuksanović-Mikuličić S, Sladoje-Martinović B, Živčić-Ćosić S. Klinička primjena mikroskopije sa faznim kontrastom u diferencijalnoj dijagnostici mikrohematurije, Acta Med Croatica. 2003;57: 9-14.
5. Orlić P, Dvornik S, Husnjak SC, Aralica M, Orlić L, Živčić-Ćosić S, Sladoje-Martinović B, Fucak M. pp65 antigenemija u praćenju citomegalovirusne infekcije nakon transplantacije bubrega. Acta med Croatica 2003;57:49-52.
6. Zec J, Čohar F, Ćuruvija D, Gržetić M, Matić-Glažar Đ, Orlić P, Razmilić D, Živčić S. Mijenjanje karakteristika bolesnika liječenih redovitom dijalizom, Acta Fac med Flum 1994;19(1): 5-11.

3. Stručni radovi

1. Živčić-Ćosić S, Gržetić M, Merlak-Prodan Ž, Đorđević G, Rački S, Orlić L. Maligni tumori nakon transplantacije bubrega, Acta Med Croatica. 2008;62(1):155.
2. Merlak-Prodan Ž, Gržetić M, Živčić-Ćosić S, Rački S, Orlić L. Smeđi tumor u bolesnice na hemodijalizi, Acta Med Croatica. 2008;62(1):144.
3. Orlić P, Vukas D, Ćuruvija D, Markić D, Merlak-Prodan Ž, Maleta I, Živčić-Ćosić S, Orlić L, Blecich G, Valenčić M, Španjol J, Budiselić B. Pseudoaneurizma nakon transplantacije bubrega, Acta Med Croatica. 2008;62(1):86-89.
4. Živčić-Ćosić S, Merlak Ž. Nacionalna lista čekanja za transplantaciju bubrega, Narodni zdravstveni list 2004; 11:538-539.

5. Živčić-Ćosić S, Vlahović A, Gržetić M, Matić-Glažar Đ i sur. Razvoj peritonejske dijalize u Kliničkom bolničkom centru Rijeka, Acta med Croatica 2004;58: 215-220.
6. Orlić L, Matić-Glažar Đ, Vlahović A, Živčić-Ćosić S, Maleta I, Martinović BS, Rački S, Madžar Z. Incidencija kroničnog bubrežnog zatajenja utijekom 35 godina u Kliničkom bolničkom centru Rijeka, Acta Med Croatica. 2004;58(1): 73-7.
7. Živčić-Ćosić S, Fucak M, Orlić P, Vujaklija-Stipanović K, Orlić L, Rački S, Gržetić M, Matić-Glažar Đ, Zelić M, Mavrić Ž. Ispitivanje i odabir kandidata za transplantaciju bubrega u kliničkom bolničkom centru Rijeka. Acta med Croatica 2003;57:65-68.
8. Živčić-Ćosić S, Matić-Glažar Đ, Legac I, Čohar F. Changes in Body Weight in Patients with Chronic Renal Failure Starting Hemodialysis Treatment, Period biol 2000;102(1): 117.
9. Christine Lambert M, Živčić-Ćosić S. Organizing a Peritoneal Dialysis Programme, Klin med 2000;6(1): 89-93.
10. Orlić P, Mozetič V, Živčić S i sur. Kidney Transplantation in the Clinical Hospital Center in Rijeka, Acta Fac med Flum 1994;19(1): 5-11.

4. Druge publikacije

2006. "Nacionalne smjernice za obradu, odabir i pripremu mogućih primatelja bubrežnog presatka", Nacionalna radna skupina za transplantaciju bubrega, Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH.

5. Kongresna priopćenja i izlaganja na stručnim skupovima

2009. „Infekcija citomegalovirusom u bolesnika s presađenim bubregom“. DiaTransplant 2009. 4. Hrvatski simpozij o nadomještanju bubrežne funkcije s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija.

2006. „Urothelia Cancer in Patients with Endemic Balkan Nephropathy after Renal Transplantation”, Međunarodni simpozij “Recent Advances in Endemic Nephropathy”, Zagreb.

2003. „Sve što ste željeli znati o peritonejskoj dijalizi, a niste se usudili pitati”, Peritonejska dijaliza danas, HLZ Rijeka.

2003. „Program transplantacije u Hrvatskoj, suradnja s Nord Italia Transplantom”, Radna skupina za transplantaciju bubrega, Milano, Italija.

2003. Organizacija, zadaci i ciljevi transplantacijskih koordinatora u španjolskom modelu te osvrt na iskustva kliničkog koordinatora za transplantaciju u KBC Rijeka, I. Tečaj za transplantacijske koordinatore, Brijuni.

2002. „Ispitivanje i odabir kandidata za transplantaciju bubrega u Kliničkom bolničkom centru Rijeka” *(nagrada za najbolji poster),* III. Hrvatski kongres nefrologije, dijalize i transplantacije s međunarodnim sudjelovanjem, Plitvička jezera.

2002. „Komplikacije liječenja peritonejskom dijalizom u KBC Rijeka 1992.-2001. godine“. III. Hrvatski kongres nefrologije, dijalize i transplantacije s međunarodnim sudjelovanjem, Plitvička jezera.

2002. „Peritonejska dijaliza u KBC Rijeka.“ Drugi hrvatski internistički kongres, Opatija.

2002. „Nekirurške komplikacije nakon transplantacije bubrega u primaoca sa suvremenom imunosupresijom u KBC Rijeka“. Drugi hrvatski internistički kongres, Opatija.

2002. „Infekcije u imunokompromitiranih bolesnika”, 8. radionica o patogenezi zaraznih bolesti, Crikvenica.

1996. „Immunosuppressive Protocol after Kidney Transplantation”, Meeting on Kidney Transplantation, Trakošćan.

1992. „Changing Pattern of Dialytic Population”, Praktični tretman bubrežne insuficijencije, Portsmouth, Engleska.