

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**MARIJANA GULIN**

**POVEZANOST IZRAŽENOSTI KOŠTANIH MORFOGENETSKIH  
PROTEINA BMP-2 I BMP-7 U VASKULARNIM STANICAMA  
PRIMATELJA S ODGOĐENOM FUNKCIJOM  
TRANSPLANTIRANOG BUBREGA**

**DOKTORSKI RAD**

**Split, 2024.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**MARIJANA GULIN**

**POVEZANOST IZRAŽENOSTI KOŠTANIH MORFOGENETSKIH  
PROTEINA BMP-2 I BMP-7 U VASKULARNIM STANICAMA  
PRIMATELJA S ODGOĐENOM FUNKCIJOM  
TRANSPLANTIRANOG BUBREGA**

**DOKTORSKI RAD**

**Mentorica:**

**prof. dr. sc. Nikolina Bašić-Jukić, dr. med.**

**Split, 2024.**

Doktorska disertacija izrađena je na Klinikama i Zavodima Kliničkog bolničkog centra Zagreb;

- Zavod za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju - Referentni centar Ministarstva zdravlja za nadomještanje bubrežne funkcije, plazmaferezu i aferezu
- Klinika za Urologiju
- Klinika za patologiju i citologiju
- Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku - Referentni centar Ministarstva zdravstva za kliničku biokemiju i molekularnu dijagnostiku
- Zavod za tipizaciju tkiva - Referentni centar Ministarstva zdravstva za tipizaciju tkiva

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Nikolina Bašić-Jukić, dr. med.

## ZAHVALA

Velik broj djelatnika/ca KBC Zagreb zaslužan je za izradu ove doktorske disertacije i svima se zahvaljujem od srca.

Posebne zahvale:

- prof. dr. sc. Nikolini Bašić Jukić dr. med., internistici subspecijalistici nefrologije na nesebičnom angažmanu, pomoći i poticaju tijekom svih faza izrade ove doktorske disertacije

- doc.dr.sci Marijani Ćorić dr. med., patologinji, subspecijalistici nefropatologije na stručnoj pomoći pri analizi patohistoloških preparata

- prof. dr.sc. biomed. Katarini Vukojević dr. med., profesorici anatomije, histologije i embriologije na korisnim savjetima i potpori

- svim bolesnicima i bolesnicama koji su nadomještali bubrežnu funkciju dijalizom i transplantacijom u čijem liječenju sam sudjelovala na suradljivosti i povjerenju

- suprugu Alenu i sinovima Marku i Marijanu na razumijevanju i potpori u svim mojim kliničkim i znanstvenim aktivnostima, a Marijanu i na velikoj pomoći u grafičkom oblikovanju ove doktorske disertacije

Ovu disertaciju posvećujem svojim učiteljima koji su me prenošenjem svojih znanja i iskustava uveli u svijet nefrologije, dijalize i transplantacije bubrega:

Ivanu Jurakiću dr. med., internisti

Prof. dr. sc. Petru Kesu dr. med., internisti subspecijalistu nefrologije

Prim. mr. sci Ljubici Bubić Filipi dr. med., internistici subspecijalistici nefrologije

Prof. dr.sc. Josipu Pasiniju dr. med., transplantacijskom urologu

## Popis oznaka i kratica

GFR	veličina glomerularne filtracije
CKD EPI	prediktivna jednadžba za rutinsko određivanje glomerularne filtracije (engl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)
KDIGO	globalne neprofitne organizacije koje izdaju važeće smjernice u
KDOQI	dijagnosticiranju i liječenju bubrežnih bolesti (engl. Kidney Disease Improving Global Outcomes, National Kidney Foundation Disease Outcomes Quality Initiative)
KBB	kroničnabubrežna bolest
ACR	omjer albumina i kreatinina u uzorku urina
HLP	hiperlipidemija
PTH	paratiroidni hormon
HD	hemodijaliza
PD	peritonealna dijaliza
CAPD/APD	modaliteti peritonealne dijalize (engl. continuous ambulatory peritoneal dialysis/ automated peritoneal dialysis)
AVH	arteriovenska fistula
Kt/V	omjer za procjenu adekvatnosti dijalize
EKG	elektrokardiogram
CT	kompjuterizirana tomografija
CMV	citomegalovirus
EBV	Epstein-Barr virus
HSV	Herpes simplex virus
VZV	Varicella-zoster virus
HBV	Hepatitis B virus
HCV	Hepatitis C virus
HIV	Virus humane imunodeficijencije (engl. <i>Human immunodeficiency virus</i> )
HLA	leukocitni antigeni čovjeka (engl. <i>Human Leukocyte Antigens</i> )
CD	protokol koji se koristi za identifikaciju površinskih molekula stanica prisutnih na leukocitima (engl. <i>Clusters of differentiation</i> )
CDC	test mikrolimfocitotoksičnosti ovisne o komplementu (engl. complement dependent cytotoxicity)
PCR	metoda molekularne biologije temeljena na lančanoj reakciji

	polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
MM	nepodudarnost antigena HLA darivatelja i primatelja (engl. <i>mismatch</i> )
PRA	određivanje HLA protutijela testom panel reaktivnih protutijela (engl. <i>panel reactive antibodies</i> )
CM	test križne reakcije limfocita darivatelja i seruma primatelja (engl. <i>crossmatch</i> )
DSA	darivatelj specifičnih protutijela (engl. <i>donor specific antibodies</i> )
APC	antigen-prezentirajuće stanice (engl. <i>antigen presenting cells</i> )
NFAT	nuklearni faktor aktiviranih limfocita T
TCR	receptor limfocita T za prepoznavanje nevlastitih antigena (engl. <i>T-cell receptor</i> )
IL	interleukin
mTOR	serin-treoninska protein kinaza koja regulira rast stanica, proliferaciju stanica, metabolizam, sintezu proteina i autofagiju (engl. <i>mammalian target of rapamycin</i> )
IFN- $\gamma$ ,	interferon gama
IFN- $\beta$	interferon beta
TNF- $\alpha$	čimbenik nekroze tumora alfa (engl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
TGF- $\beta$	transformirajući čimbenik rasta beta (engl. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
MMF	Mikofenolat mofetil
MPA	mikofenolična kiselina (engl. <i>mycophenolic acid</i> )
ALG	kunićja poliklonalna protutijela protiv humanih limfocita T
ATG	kunićja poliklonalna protutijela protiv humanih timocita
Ig	imunoglobulini
UZV	ultrazvuk
CD-UZV	Color Doppler ultrazvuk
MR	magnetska rezonanca
PTA	perkutana transluminalna angioplastika
VSMC	vaskularne glatke mišićne stanice (engl. <i>vascular smooth muscle cells</i> )
DGF	odgođena funkcija transplantiranog bubrega (engl. <i>delayed graft function</i> )
IGF	neposredna funkcija transplantata (engl. <i>immediate graft function</i> )
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i> )
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygene species</i> )

ATP	adenozin trifosfat
NO	dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i> )
TLR	receptori slični Tollu uključeni u pokretanje imunološkog odgovora (engl. <i>Toll-like receptors</i> )
DAMP	molekularni obrasci povezani s oštećenjem stanica (eng. <i>damage-associated molecules patterns</i> )
NF-κB	nuklearni faktor kapa B (engl. <i>nuclear factor kappa-B</i> )
NGAL	biomarker tubularnog oštećenja (engl. <i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i> )
MCP-1	monocitni kemoatraktantni protein -1 (engl. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
HIF	inducibilni faktor hipoksije (engl. <i>hypoxia-inducible factor</i> )
PHDs	enzimi prolil-hidroksilaze ovisni o kisiku (engl. <i>prolyl hydroxylase domain enzymes</i> )
BMP	koštani morfogenetski proteini (engl. <i>bone morphogenetic protein</i> )
RUNX2	transkripcijski faktor 2 povezan s Runtom (engl. <i>Runt-related transcription factor 2</i> )
OPG	osteoprotegerin
RANKL	aktivatori receptora liganda nuklearnog faktora kapa-B (engl. <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> )
M-CSF	faktor stimulacije kolonija makrofaga (engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i> )
ED	endotelna disfunkcija
VCAM-1	vaskularna adhezijska molekula-1 (engl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> )
ICAM-1	unutarstanična adhezijska molekula 1 (engl. <i>intercellular adhesion molecule-1</i> )
CDMP	hrskavični morfogenetski proteini (engl. <i>cartilage derived morphognetic proteins</i> )
GDF	faktori rasta i diferencijacije (engl. <i>growth and differentiation factor</i> )
ALK	aktivin kinazni receptor tip 1 za koštane morfogenetske proteine (engl. <i>activin receptor-like kinase</i> )
ActRIIA,	receptori tip 2 za koštane morfogenetske proteine

ActRIIB,	
BMPRIIB,	
TGF $\beta$ RII,	
AMHRII	
Smad	molekule unutarstanične signalizacije koštanih morfogogenetskih proteina (engl. <i>small protein Caenorhabditis elegans</i> -Sma /engl. <i>mothers against decapentaplegic-Mad</i> )
MAPK p38	mitogenom aktivirana kinaza p38 (engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i> )
CRP	C reaktivni protein
LDL	lipoproteini niske gustoće (engl. <i>low density lipoproteins</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
KBC	Klinički bolnički centar
RTG	radiološka snimka



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1 KRONIČNA BUBREŽNA BOLEST.....	1
1.2 NADOMJEŠTANJE BUBREŽNE FUNKCIJE.....	4
1.2.1 HEMODIJALIZA.....	6
1.2.2 PERITONEALNA DIJALIZA.....	8
1.2.3 TRANSPLANTACIJA BUBREGA.....	10
1.2.3.1 PRIPREMA ZA TRANSPLANTACIJSKO LIJEČENJE.....	10
1.2.3.2 IMUNOLOŠKI TESTOVI U TRANSPLANTACIJSKOM LIJEČENJU.....	12
1.2.3.3 KIRURŠKI PRINCIPI TRANSPLANTACIJSKOG LIJEČENJA.....	14
1.2.3.4 IMUNOSUPRESIVI U TRANSPLANTACIJSKOM LIJEČENJU.....	16
1.2.3.5 KOMPLIKACIJE TRANSPLANTACIJSKOG LIJEČENJA.....	22
1.3. ODGOĐENA FUNKCIJA TRANSPLANTIRANOG BUBREGA.....	27
1.4. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI.....	31
1.4.1 SINTEZA I AKTIVNOST BMP-2 I BMP-7.....	32
1.4.2 BMP-2 I BMP-7 U EMBRIONALNOM RAZVOJU.....	34
1.4.3 BMP-2, BMP-7 I HOMEOSTAZA TKIVA I ORGANA.....	35
1.4.4 BMP-2, BMP-7 I VASKULARNI KALCIFIKATI.....	37
<b>2. CILJ RADA I HIPOTEZA</b> .....	41
<b>3. ISPITANICI I POSTUPCI</b> .....	43
3.1 ISPITANICI.....	43
3.2 POSTUPCI.....	44
3.2.1 IMUNOGENETIČKI TESTOVI.....	44
3.2.2 PRIKUPLJANJE UZORAKA EPIGASTRIČNE ARTERIJE.....	45
3.2.3 IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJENJE ZA BMP-2 I BMP-7.....	46
3.2.4 VON KOSSA BOJENJE ZA MIKROKALCIFIKATE.....	46
3.2.5 MIKROSKOPIRANJE.....	47
3.2.6 PROCJENA FUNKCIJE TRANSPLANTIRANOG BUBREGA.....	47
3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	50

<b>4. REZULTATI</b> .....	53
4.1 OPĆA OBILJEŽJA ISPITANIKA I DARIVATELJA.....	53
4.2 IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7 U ENDOTELNIM I GLATKIM MIŠIĆNIM STANICAMA ARTERIJA ISPITANIKA I KONTROLNA.....	53
4.3 VASKULARNE KALCIFIKACIJE I IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7.....	58
4.3.1.RADIOLOŠKI VERIFICIRANI VASKULARNI KALCIFIKATI I IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7.....	58
4.3.2VON KOSSA BOJENJEM POTVRĐENI VASKULARNI KALCIFIKATI I IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7 .....	61
4.4 ODGOĐENA FUNKCIJA TRANSPLANTATA I IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7.....	62
<b>5. RASPRAVA</b> .....	68
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	82
<b>7. LITERATURA</b> .....	84
<b>8. SAŽETAK</b> .....	104
<b>9. ABSTRACT</b> .....	106
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	108

## 1.UVOD

### 1.1.KRONIČNA BUBREŽNA BOLEST

Bubreg je parni respiratorno pomični organ smješten retroperitonealno u trbušnoj šupljini, veličine 9 do 12 cm. Glavna strukturna i funkcionalna jedinica bubrega jest *nefron* (1). Svaki bubreg u prosjeku ima oko milijun nefrona, što je određeno brojem pri rođenju te stečenim promjenama (2).

Bubrežne su funkcije mnogobrojne. Ekskretornom funkcijom bubreg održava homeostazu, osmolalnost i pH neutralnost tjelesnih tekućina izlučivanjem vode, elektrolita i razgradnih proizvoda metabolizma proteina. Endokrine funkcije bubrega omogućuju sintezu eritropoetina, renina, bubrežnih prostaglandina te pretvorbu vitamina D u aktivan oblik kalcitriol (1, 3). Eritropoetin potiče eritrocitopoezu u koštanoj srži, renin potiče sintezu angiotenzina i aldosterona važnih za regulaciju arterijskog tlaka, a kalcitriol sudjeluje u održavanju mineralno-koštane ravnoteže. Metaboličke funkcije bubrega jesu glukoneogeneza, razgradnja aminokiselina, razgradnja i izlučivanje lijekova, hormona, endogenih i egzogenih toksina (1).

Bubrežna bolest nastaje zbog narušene morfologije i/ili funkcije bubrega, a kroničnom se smatra ako traje dulje od tri mjeseca. Dijagnoza se postavlja laboratorijskim pretragama krvi i urina, radiološkim, radioizotopnim i ultrazvučnim slikovnim metodama te biopsijom bubrega. Bubrežna funkcija procjenjuje se određivanjem glomerularne filtracije (GFR), odnosno količinom filtrata (urina) u jedinici vremena u oba bubrega (ml/min) (4).

Glomerularnu filtraciju najbolje je procijeniti klirensom kreatinina za što je potrebno odrediti vrijednost kreatinina u krvi i 24-satnom urinu. Sakupljanje urina tijekom 24 sata je nepraktično, stoga K-DOQI (engl. *National Kidney Foundation Disease Outcomes Quality Initiative*) preporuča procjenu GFR-a prediktivnim jednadžbama koje se temelje na vrijednosti kreatinina u krvi i osnovnim demografskim obilježjima (dob, spol i rasa). CKD EPI (engl. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) prediktivna jednadžba ( $141 \times (\text{kreatinin u serumu})^{-1.209} \times 0,993^{\text{dob}}$  za muškarce, odnosno  $\times 0,742^{\text{dob}}$  za žene) preporučena je za rutinsko određivanje GFR-a prema važećim nefrološkim smjernicama KDIGO-a (engl. *Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*) (4, 5). Biokemijsko-hematološki medicinski laboratoriji diljem svijeta, pa

tako i u Hrvatskoj, uz svaki nalaz kreatinina u serumu procjenjuju bubrežnu funkciju prediktivnom jednačbom GFR CKD-EPI.

Određivanje stadija kronične bubrežne bolesti (KBB) temelji se na GFR-u i albuminuriji.

(4).

Kronična bubrežna bolest podijeljena je u pet stadija (4):

- Stadij 1: Normalna GFR ( $\geq 90$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) uz poznatu strukturnu ili nasljednu bolest bubrega
- Stadij 2: GFR 60 – 89 ml/min /1,73 m<sup>2</sup>
- Stadij 3a: GFR 45 – 59 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>
- Stadij 3b: GFR 30 – 44 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>
- Stadij 4: GFR 15 – 29 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>
- Stadij 5: GFR < 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>

Albuminurija je podijeljena u tri kategorije s obzirom na vrijednosti u 24-satnom urinu ili omjer albumina i kreatinina u urinu (URIN ACR):

- A1 - <30 mg/24-satni urin ili URIN ACR < 3 mg/mmol (<30 mg/g)
- A2 - 30-300 mg/24-satni urin ili URIN ACR 3-30 mg/mmol (30 – 300 mg/g)
- A3- >300 mg/24-satni urin ili URIN ACR >30 mg/mmol (>300 mg/g).

Čimbenici rizika za razvoj KBB-a dijele se u dvije skupine. Prvu skupinu čine oni na koje nije moguće djelovati, tzv. nepromjenjivi, a drugu skupinu čimbenici rizika na koje je moguće djelovati, tzv. promjenjivi. Čimbenici rizika u prvoj skupini su: starija životna dob, spol i pozitivna obiteljska anamneza a u drugoj skupini: šećerna bolest, arterijska hipertenzija, srčano-žilne bolesti, hiperlipidemija (HLP), anemija, pretilost i pušenje (6). Vodeći su uzroci KBB-a šećerna bolest i arterijska hipertenzija (7).

U KBB-u dolazi do smanjenja broja nefrona – osnovne funkcijske jedinice bubrega, no kompenzacijski mehanizmi mogu dulje vremena održavati ekskrecijske, endokrine i metaboličke funkcije bubrega. Objašnjenje za taj fenomen – održavanje funkcije bubrega uz smanjen broj nefrona – daje tzv. teorija o intaktnom nefronu prema kojoj preostali još uvijek zdravi nefroni funkcionalno i anatomski hipertrofiraju i preuzimaju funkciju propalih nefrona; gubitak 75 % funkcionalnih nefrona dovodi do sniženja GFR-a na 50 % od normalnih

vrijednosti. Patofiziološke promjene zbog smanjenja bubrežne funkcije napreduju na dosta predvidljiv način, ali uglavnom bez kliničkih simptoma u ranijim stadijima KBB-a (8). Serumska koncentracija kalcitriola – aktivnog oblika vitamina D neophodnog za ravnotežu kalcija, fosfora te pregradnju kosti smanjuje se kada je GFR < 40 ml/min. Posljedično tome, do neravnoteže fosfata, kalcija, paratiroidnog hormona (PTH) i urata dolazi kod GF < 30 ml/min. Rezultat ovih poremećaja dovodi do poremećaja morfologije kosti te kalcifikacija krvnih žila (6, 9). Smanjena sinteza eritropoetina u peritubularnim epitelnim stanicama nefrona glavni je uzrok anemije u KBB-u, uz smanjenu raspoloživost željeza za eritropoezu te brže propadanje eritrocita zbog krhkosti kapilara (5). Metabolička acidoza zbog nedostatne reapsorpcije bikarbonata razvija se kod GFR < 20 ml/min, uzrokuje gubitak mišića zbog katabolizma proteina te gubitak koštane mase zbog koštanog puferiranja kiselina. Krvne vrijednosti krajnjih produkata metabolizma proteina (ureja, kreatinin) počinju nelinearno rasti padom GFR-a, a izrazito su povišene kod pada GF < 15 ml/min i povezane su s kliničkim sindromom KBB-a (uremijom). Kod GFR < 10 ml/min dolazi do znatnog zadržavanja vode u organizmu, dilucijske hiponatrijemije, hiperkalijemije i tada je potrebno nadomještati bubrežnu funkciju dijalizom ili bubrežnim transplantatom (10).

Kronična bubrežna bolest uznapredovalih stadija negativno se odražava na mnogobrojne organske sustave: hematopoetski, kardiovaskularni, cerebrovaskularni i gastrointestinalni. Kardiovaskularne bolesti vodeći su uzrok morbiditeta i mortaliteta u osoba s KBB-om: 35 – 40 % bolesnika ima kardiovaskularne komplikacije (11-13). NEOERICA (engl. *The New Opportunities for Early Renal Intervention by Computerised Assessment*) istraživanje provedeno u Velikoj Britaniji pokazalo je prevalenciju ishemijske bolesti srca od 25 % u populaciji bolesnika s KBB3.– 5. stadija, što je više nego dvostruko u odnosu na populaciju bez KBB-a. Istraživanje hrvatskih autora upućuje na povećanu učestalost kongestivnog srčanog zatajenja, cerebrovaskularne, ali i periferne vaskularne bolesti uz KBB (14). Povećana učestalost kognitivnih poremećaja i demencije u bolesnika s KBB-om, kao i ishemijskih cerebralnih lezija uzrokovana je oštećenjem neurona uremijskim toksinima (15). Veća učestalost erozivnih bolesti gastrointestinalnog trakta praćenih krvarenjima posljedica je visoke razine gastrina, hormona koji se izlučuje bubrežima (16).

Kronična bubrežna bolest velik je javnozdravstveni problem zbog svoje učestalosti, ali i porasta novooboljelih svake godine. Od 2002. do 2016. godine u SAD-u broj bolesnika s KBB-om porastao je za 52 %, dominantno zbog povećanja populacije, produljenja životne

dobi, ali i boljeg probira na KBB (17). Globalna prevalencija KBB-a iznosi 10 – 15 %. Podatci nisu neočekivani jer se prevalencija šećerne bolesti i arterijske hipertenzije, što su dva vodeća uzroka KBB-a, višestruko povećala zadnjih desetljeća (18). Bolesnici u 5. stadiju KBB-a financijski znatno opterećuju zdravstveni sustav, a izloženi su visokom riziku smrtnog ishoda. Rješenje za probir na KBB ranijih stadija mogu biti analitički kompjutorski modeli koji mogu prepoznati bolesnike s rizikom za KBB i njihovo praćenje kako bi se usporilo napredovanje do KBB-a 5. stadija (19).

## 1.2.NADOMJEŠTANJE BUBREŽNE FUNKCIJE

U bolesnika s KBB-om 5. stadija, kada je GFR  $<10$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> uz kliničke znakove preopterećenja tekućinom i metaboličkih poremećaja povezanih s uremijom potrebno je započeti s nadomještanjem bubrežne funkcije nekom od metoda dijalize ili transplantacijom bubrega (20).

**Tablica 1.** Apsolutne indikacije za nadomještanje bubrežne funkcije (adaptirano prema Bleyer)(21)

<b>APSOLUTNE INDIKACIJE ZA DIJALIZNO LIJEČENJE</b>
Anurija količina urina < 50 ml/12sati
Oligurija količina urina < 200ml/12sati
Volumno opterećenje refratkorno na diuretsko liječenje
plućni edem, perikardijalni, pleuralni i periferni edemi
Neregulirana arterijska hipertenzija refraktorna na antihipertenzivno liječenje
Elektrolitski poremećaji refraktorni na konzervativno liječenje
hiperkalijemija, hipo/hiperkalcemija, hiperfosfatemija, hipo/hipernatrijemija
Metabolička acidoza refraktorna na konzervativno liječenje (pH < 7,1)
Uremijska encefalopatija, neuropatija
Uremijska hemoragijska dijateza

Nadomjesno bubrežno liječenje omogućuje održavanje bolesnika na životu uz njegovu prihvatljivu kvalitetu. Kako je tek manji dio bolesnika podoban za transplantacijsko liječenje, većini preostaje izbor između hemodijalize (HD) i peritonealne dijalize (PD). Odabir metode ovisi o kliničkom i psihološkom profilu bolesnika, pridruženim bolestima i socio-ekonomskim životnim uvjetima. Dijalizne metode, za razliku od transplantacije bubrega, nadomještaju samo egzokrinu, a ne i endokrinu i metaboličku funkciju bubrega (22).

Dijaliza je proces u kojem dolazi do izmjene otopljenih tvari dviju tekućina kroz polupropusnu membranu. Dva su načina prijenosa otopljenih tvari u dijalizi: difuzija i

ultrafiltracija. Difuzija je proces prolaska molekula niz koncentracijski gradijent, odnosno iz područja više k području niže koncentracije. Ultrafiltracija je proces prolaska vode kroz polupropusnu membranu koji se odvija pod povećanim hidrostatskim ili osmotskim tlakom (23).

### 1.2.1. HEMODIJALIZA

Izraz hemodijaliza izveden je od riječi „hemo“ (grčki *haima*), što označava krv i dijaliza (grčki *dialysis*), što označava odvajanje i otapanje. Hemodijaliza je postupak izvantjelesnog odstranjivanja tvari koje se nakupljaju u organizmu zbog KBB-a 5. stadija s ciljem održavanja sastava i volumena tjelesnih tekućina (24, 25). Hemodijalizom se primjenom polupropusnih membrana uklanjaju iz krvi niskomolekulske tvari koje se kod uredne bubrežne funkcije odstranjuju urinom, dok krvne stanice i visokomolekulske tvari ostaju u krvnom optoku.

Za provođenje HD potrebni su krvožilni pristup, uređaj za HD, krvne linije, dijalizator i dijalizna tekućina – dijalizat (24).

Krvožilni pristupi mogu biti arteriovenska nativna fistula (AVF), arteriovenski graft, netunelirani ili tunelirani centralni venski kateter.

AVF se stvara kirurškim termino-lateralnim anastomoziranjem radijalne ili brahijalne arterije s pratećom venom. Ako je prateća vena neadekvatna, ugrađuje se protetski umetak i stvara se arteriovenski graft. AVF može se koristiti tek dva do tri mjeseca nakon stvaranja, stoga je u bolesnika s KBB-om potrebno planirati stvaranje AVF-a nekoliko mjeseci prije započinjanja liječenja HD-om. Komplikacije AVF-a i graftova su stenoza, tromboza, aneurizma, pseudoaneurizma i infekcija.

Dijalizni centralni venski kateter upotrebljava se ako AVF još nije stvorena ili stvaranje nije moguće. Optimalno mjesto za postavljanje dijaliznog centralnog venskog katetera jest desna unutarnja jugularna vena. Netunelirane dijalizne centralne venske katetere ne bi trebalo koristiti dulje od šest do osam tjedana. Kateteri postavljeni kroz potkožni tunel – tzv. „tunelirani kateteri“ imaju dulji vijek trajanja (i do pet godina). Nedostatci su dijaliznog centralnog venskog katetera razmjerno uski promjer katetera koji ne dopušta dovoljno velik protok krvi za postizanje optimalnog HD-a, rizik od infekcije na mjestu izlazišta katetera i tromboze.



Za adekvatni HD krvožilni pristup mora osigurati protok krvi od 200 do 400 ml/min. Za sprečavanje zgrušavanja krvi u izvantjelesnom krvnom optoku tijekom HD-a koristi se heparin, citrat ili se provodi intermitentno ispiranje krvnih linija fiziološkom otopinom (26).

Uređaj za HD sastoji se od krvne pumpe, dijalizne pumpe, sustava za pripremu dijalizata, sustava senzora kojima se osigurava siguran tijek postupka. Na uređaj za HD postavlja se dijalizator, koji je „srce“ dijalize. Dijalizator ima četiri otvora od kojih dva komuniciraju s krvnim linijama (krvni dio), a dva s prostorom za dijaliznu otopinu (dovod i odvod dijalizne tekućine). Dijalizna otopina izotonična je otopina NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> i glukoze, po sastavu slična krvnoj plazmi bez proteina. Unutar dijalizatora nalaze se cjevčice čiju stijenkku čini polupropusna membrana građena od supstituirane celuloze ili sintetskog materijala (polisulfon, polikarbonat, poliakrilonitril, polimetilmetakrilat). Veličina, građa i debljina polupropusne membrane utječu na sposobnost propuštanja uremijskih toksina i vode (27, 28).

Arterijskom linijom bolesnikova krv dolazi do dijalizatora, zatim se razdjeljuje u cjevčice oko kojih teče dijalizat. Dijalizat i krv bolesnika protiču u suprotnim smjerovima kroz dijalizator kako bi se povećao koncentracijski gradijent unutar cijelog dijalizatora i kako bi pročišćavanje krvi bilo što učinkovitije. Nakon postupka pročišćavanja krvi difuzijom i ultrafiltracijom, krv se venskom linijom vraća bolesniku (27).

Uobičajeno se HD provodi tri puta tjedno u trajanju od četiri sata (26). Komplikacije HD-postupka ima 10 do 20 % bolesnika. Najčešće su epizode hipotenzije, mišićni grčevi, mučnina, povraćanje i glavobolja. Adekvatnost postupka HD-a procjenjuje se mjerenjem razine ureje prije i poslije svakog postupka. Smanjenje razine ureje  $\geq 65$  % nakon postupka u odnosu na razinu ureje prije postupka (formula  $[\text{konc. ureje prije dijalize} - \text{konc. ureje poslije dijalize}] / \text{konc. ureje prije dijalize} \times 100\%$  je  $\geq 65\%$ ) upućuje na to da je postupak adekvatan. Preciznije se adekvatnost određuje Kt/V omjerom (dostupno na HD uređaju) gdje K predstavlja klirens ureje u dijalizatoru u ml/min, t trajanje dijalize u minutama, a V volumen distribucije ureje, tj. ukupnu tjelesnu vodu u ml. Prihvatljiv Kt/V je  $> 1,0$ , optimalan je Kt/V  $> 1,2$ , dok je Kt/V  $< 0,8$  povezan s većim morbiditetom i mortalitetom HD bolesnika (29).

Nedostatna adekvatnost i doza HD-a dovodi do volumnog opterećenja bolesnika, neregulirane arterijske hipertenzije, hiperkalijemije i s njom povezanih srčanih aritmija. Adekvatnost HD-a

povećava se produljenjem dijaliznog postupka, povećavanjem protoka krvi i dijalizata te povećanjem površine i/ili propusnosti dijalizne membrane u dijalizatoru (27).

Poboljšanje u bolesnika liječenih HD-om može biti posljedica tehnike liječenja i krvožilnog pristupa, ali je najčešće vezano za uremijski sindrom, njegove komplikacije i pridružene bolesti. Preživljenje bolesnika koji nadomještaju bubrežnu funkciju HD-om osim o adekvatnosti HD-a ovisi o osnovnoj bubrežnoj bolesti, pridruženim bolestima, ispravku anemije (ciljni hemoglobin 110 g/L). Ukupna godišnja smrtnost HD-bolesnika iznosi 20 %, vodeći su uzroci krvožilne bolesti (50 %) i infekcije (15 – 20 %) (26).

### 1.2.2. PERITONEALNA DIJALIZA

Peritonealna dijaliza metoda je dijalize koja se odvija unutar tijela, u trbušnoj šupljini, a tanka, prozirna, serozna membrana koja oblaže peritonealnu šupljinu „postaje“ dijalizna membrana. Dvije otopine koje sudjeluju u prijenosu tvari i vode kroz peritonealnu membranu jesu krv u peritonealnim kapilarama i dijalizna otopina u peritonealnoj šupljini.

Kao što je za HD potreban krvožilni pristup, tako je za PD potreban pristup trbušnoj šupljini, a to je silikonski ili poliuretanski kateter koji se kroz trbušnu stijenu laparaskopski implantira u peritonealni prostor. Većina katetera ima poliuretansku obujmicu koja omogućuje uraštavanje veziva iz kože i potkožja, čime nastaje barijera nepropusna za vodu i bakterije prevenirajući tako ulazak mikroorganizama uz kateter u trbušnu šupljinu. Dijalizna je otopina sterilna otopina prema elektrolitnom sastavu slična plazmi (sadrži elektrolite natrij, kalcij, magnezij, klorid, pufer koji služi za korekciju metaboličke acidoze laktat ili bikarbonat), a kao osmotski spoj primjenjuje se glukoza, polimer škroba – ikodekstrin ili aminokiseline (30).

Bolesnici koji se odluče za PD kao oblik nadomještanja bubrežne funkcije, terapiju provode sami kod kuće, stoga ih je potrebno educirati o postupanju s peritonejskim kateterom, o izmjenama dijalizne otopine, o mogućim komplikacijama postupka. Dijalizat se kroz kateter u aseptičnim uvjetima utoči u trbušnu šupljinu, gdje se ostavlja određeno vrijeme, najčešće četiri do šest sati i nakon toga istoči se gravitacijskom tehnikom iz trbušne šupljine. Tehnikom dviju vrećica bolesnik prazni dijaliznu tekućinu s odstranjenim uremijskim toksinima i viškom vode iz trbuha u „otpadnu“ vrećicu, a potom utiče novu dijaliznu tekućinu.

Liječenje PD-om dijelimo na dvije osnovne metode, i to: kontinuiranu ambulatornu peritonejsku dijalizu CAPD (engl. *continuous ambulatory peritoneal dialysis*) i

automatiziranu peritonejsku dijalizu APD (engl. *automated peritoneal dialysis*). Kod CAPD-a educirani bolesnici samostalno izmjenjuju otopine za dijalizu (1500 – 2000 ml) pomoću sustava vrećica, najčešće četiri puta dnevno, čime se osigurava 24-satna dijaliza, a kod APD-a uređaj za dijalizu (engl. *cycler*) ciklički puni i prazni trbušnu šupljinu, najčešće noću, prema unaprijed zadanom programu (8000 – 12000 ml, trajanja šest do devet sati) (31).

Ovisno o građi tijela i težini bolesnika, ukupna površina peritonejske membrane može iznositi 1,7 do 2 m<sup>2</sup>, ali njezina efektivna površina ovisi o anatomskim čimbenicima i peritonejskom protoku krvi. Visceralni i parijetalni peritoneum sastoji se od jednog sloja mezotelnih stanica koji leži na submezotelnom vezivnom tkivu u kojem se nalaze kapilare i limfne žile. U endotelu peritonejskih kapilara tri su vrste pora: ultramale pore, tzv. akvaporini, male i velike pore kojima se odvija prolaz vode, uremičkih toksina i proteina (32, 33). Brzina protoka krvi u kapilarama peritonejske membrane znatno je sporija od onih koji se postižu tijekom HD-a, 70 ml/min naspram 300 – 400 ml/min te je posljedično odstranjivanje (klirens) ureje i drugih uremičkih toksina male molekularne mase u jedinici vremena puno manje u PD-u nego u HD-u. Međutim, PD se u bolesnika provodi kontinuirano, svakog dana, a ne intermitentno četiri sata tri puta tjedno, kao što je slučaj s HD-om, stoga je djelotvornost ovih dviju metoda podjednaka.

Individualne razlike u građi i funkciji peritonejske membrane određuju brzinu prijelaza otopljenih tvari iz krvi u dijalizat. Za ispitivanje funkcije peritonejske membrane najčešće se koristi peritonejski ekvibracijski test (PET). Ovaj test provodi se dva tjedna nakon postavljanja PD-katetera, kako bi se procijenile transportne osobine individualnog peritoneuma, potrebna doza dijalize i utvrdila optimalna metoda PD-a. Odgovarajuća dinamika odstranjivanja otopljenih tvari niske molekularne težine procjenjuje se određivanjem klirensa ureje i kreatinina, a kod ostatne bubrežne funkcije (24-satna diureza > 100 ml) određuje se i ostatni bubrežni klirens. Preporučeno je da ukupni Kt/Vureje iznosi najmanje 1,7 (poželjno 2,0) (30, 34).

Liječenje PD-om najčešće otežavaju mehaničke komplikacije vezane za kateter ili povišen intraabdominalni tlak te infekcijske komplikacije; infekcije izlazišta PD-katetera i peritonitisi. Prosječno se javlja jedna epizoda peritonitisa na dvije do tri godine liječenja bolesnika PD-om. Najčešći put infekcije jest intraluminalno kroz kateter, kontaminacijom prilikom utoka dijalizne tekućine u trbušnu šupljinu gram-pozitivnim bakterijama s kože. Znatno su rjeđi peritonitisi uzrokovani gram-negativnim uzročnicima transmuralnim prijelazom crijevnih

bakterija. Adekvatnom intraperitonealnom antimikrobnom terapijom peritonitisi se uspješno liječe.

Najčešći razlozi gubitka ove metode nadomještanja bubrežne funkcije i prijelaza na liječenje HD-om opetovani su peritonitisi, mehaničke komplikacije s PD-kateterom, nedostatna doza dijalize, gubitak dijalizne funkcije peritonejske membrane zbog razvoja fibroze i skleroze.

Za razliku od HD-a, bolesnici koji se liječe PD-om nisu ovisni o uređaju i terminima postupka u zdravstvenim ustanovama, a boljoj kvaliteti života pridonose manje restriktivna dijeta i unos tekućine, bolja kontrola krvnog tlaka i bubrežne anemije. Liječenje biokompatibilnim dijaliznim tekućinama smanjuje oštećenje peritonejske membrane i omogućuje dulje održavanje ostatne bubrežne funkcije (35).

### 1.2.3. TRANSPLANTACIJA BUBREGA

Rezultat velikih napora znanstvenika i kliničara, ali i velikog povjerenja koje svojim liječnicima iskazuju bolesnici sa završnim stadijem KBB-a jest suvremena transplantacijska medicina koja predstavlja jednu od najsloženijih grana medicine. Isprepletanje bazičnih znanosti, filigranske skrbi za bolesnika i profinjjenih kirurških tehnika dodatno je komplicirano činjenicom da se radi o etički i moralno vrlo zahtjevnom području.

Transplantacija bubrega najbolja je metoda nadomještanja bubrežne funkcije. Ovaj način liječenja bolesnicima omogućava kvalitetu života najbližu onoj koju su imali s funkcionalnim bubregom (36). Iako bolesnici s funkcionalnim transplantiranim bubregom imaju dulji životni vijek od onih liječenih HD-om ili PD-om, on je još uvijek kraći nego u općoj populaciji iste dobi (37).

Transplantacija bubrega može se učiniti preventivno u 5. stadiju KBB-a prije započinjanja nadomještanja bubrežne funkcije, no najčešće se provodi u bolesnika koji se liječe HD-om ili PD-om.

#### 1.2.3.1. Priprema za transplantacijsko liječenje

Detaljna predtransplantacijska obrada svakog potencijalnog primatelja bubrega ima za cilj prepoznavanje patoloških stanja koja bi ga mogla životno ugroziti tijekom i nakon transplantacije bubrega. Predtransplantacijska obrada uključuje niz laboratorijskih, imunoloških te specijalističkih pregleda i pretraga: elektrokardiogram (EKG), radiogram

prsnog koša, abdomena i male zdjelice, ultrazvučni pregled srca, trbuha, dojki, krvnih žila vrata, zdjelice i donjih ekstremiteta, gastroskopiju, ginekološki, urološki, otorinolaringološki, stomatološki, oftalmološki, neurološki i psihijatrijski pregled. Dio bolesnika, ovisno o pridruženim bolestima i nalazima osnovne predtransplantacijske obrade, trebat će dodatne pretrage: test opterećenja, 24-satni EKG, koronarografiju, CT toraksa, abdomena i male zdjelice, angiografiju, kolonoskopiju, cistoskopiju. Aktivna i latentna infekcija moraju biti otkrivene prije transplantacije kako bi se smanjio rizik od pogoršanja ili aktiviranja postojeće latentne infekcije kod primatelja nakon uvođenja imunosupresivne terapije. Ovaj probir uključuje testove za citomegalovirus(CMV), *Epstein-Barr virus* (EBV), Herpes simplex virus(HSV), Varicella-zoster virus(VZV), Hepatitis B i C virus(HBV, HCV), humani imunodeficijencijski virus(HIV), *Toxoplasma gondii* i *Mycobacterium tuberculosis*. Pozitivni nalaz može zahtijevati posttransplantacijsku antivirusnu terapiju (npr. za CMV ili HBV) ili može predstavljati kontraindikaciju za transplantaciju sve dok se infekcija ne stavi pod kontrolu. Potencijalnim primateljima bubrega treba učiniti probir na maligne bolesti prema preporukama koje vrijede za opću populaciju, a potrebno je potvrditi i da je transplantacija moguća i s kirurškog stajališta (36).

Iako su apsolutne kontraindikacije za transplantaciju bubrega rijetke (proširena maligna bolest, aktivna sustavna infekcija, teške neispravljive srčano-žilne bolesti, plućne bolesti i/ili bilo koja bolest s očekivanim trajanjem života kraćim od dvije godine), od svih bolesnika koji bubrežnu funkciju nadomještaju dijalizom za transplantaciju je podobno svega 25 – 30 %.

Relativne kontraindikacije za transplantacijsko liječenje izraziti su adipozitet, aktivna peptička ulkusna bolest, kronični aktivni virusni hepatitis, psihoza. Infekcije poput kroničnog hepatitisa C, B ili infekcije HIV-om u ranijim dekadama smatrane su apsolutnim kontraindikacijama za transplantacijsko liječenje, a posljednjih petnaestak godina svjedočimo dobrim transplantacijskim ishodima ovih bolesnika (38, 39). Rutinska nefrektomija nativnog bubrega ne preporučuje se osim u slučaju ponavljajućih infekcija nativnih bubrega, bolesnika s autosomnom policističnom bolešću bubrega kada zbog veličine nativnog bubrega nema dovoljno mjesta za transplantat ili kod endemske nefropatije (nefropatija aristolohične kiseline) zbog povećanog rizika maligne bolesti mokraćnog sustava (40).

Bubreg se može presaditi sa živog srodnog ili nesrodnog darivatelja ili umrlog darivatelja (kadavera). Korištenje organa umrlih darivatelja omogućilo je transplantacijsko liječenje

velikog broja bolesnika, ali potražnja je još uvijek daleko veća od ponude organa pa nemali broj bolesnika čeka na transplantacijsko liječenje. Republika Hrvatska je od 2007. godine članica Eurotransplanta, neprofitne organizacije osam zemalja, ukupne populacije od 135 milijuna stanovnika, s većom mogućnošću pronalaska najpogodnijeg organa za presađivanje. Potencijalni primatelji bubrega upisuju se u bazu podataka u Informacijski sustav Eurotransplanta ENIS (engl. *Eurotransplant network information system*). Postupak dodjele bubrega obavlja se računalnim programom Eurotransplanta, uspoređujući karakteristike darivatelja i primatelja te uzimajući u obzir druge zadane kriterije kao što su stupanj hitnosti, podudarnost u krvnoj grupi, imunološka podudarnost, duljina liječenja dijalizom, udaljenost između davateljske bolnice i transplantacijskog centra. Tim liječnika iz svih osam zemalja članica Eurotransplanta redovito pregledava ove kriterije kako bi dodjela organa bila što pravednija i utemeljena na najnovijim medicinskim saznanjima (40).

U Hrvatskoj 90 % doniranih bubrega potječe od umrlih darivatelja. Oko trećine ovih bubrega su granični s obzirom na fiziološka ili postupkom uzrokovana oštećenja, ali se ipak koriste jer je potražnja tako velika. Marginalnim darivateljima ili darivateljima po proširenim kriterijima smatraju se osobe starije od 59 godina te osobe dobi između 50 i 59 godina uz dva dodatna kriterija: smrt uzrokovana cerebrovaskularnom bolesti, maksimalan predtransplantacijski kreatinin u serumu veći od 137  $\mu\text{mol/L}$ , arterijska hipertenzija u anamnezi (41). Ako se transplantira bubreg darivatelja po proširenim kriterijima, potrebno je učiniti predtransplantacijsku biopsiju kako bi se procijenila kvaliteta organa. Primjenom Remuzzijeve bodovne ljestvice procjenjuje se i stupnjuje udio skleroze glomerula, atrofije tubula, fibroze intersticija, suženje arteriola, a potom odlučuje o podobnosti organa za presađivanje. Remuzzijev bod 0 do 3 čini donirani bubreg prihvatljivim za transplantaciju, bod 4 do 6 zahtijeva transplantaciju oba bubrega jednog darivatelja jednom primatelju, a kod boda 7 ili više transplantacija je neprihvatljiva (42, 43).

#### 1.2.3.2. Imunološki testovi u transplantacijskom liječenju

Imunološki sustav primatelja odgovoran je za visokospecifičnu imunološku reakciju na strane antigene darivatelja bubrega, što je nepoželjno u transplantacijskom liječenju. Jačina imunološkog odgovora ovisi o tkivnoj podudarnosti primatelja i darivatelja, ali i o primijenjenom imunosupresivnom liječenju primatelja. Glavni sustav tkivne podudarnosti MHC (od engl. *major histocompatibility complex*), koji se u čovjeka naziva sustavom HLA

(od engl. *human leukocyte antigens*), odgovoran je za kontrolu i regulaciju imunološkog odgovora. Više od 200 gena sustava HLA (1 % ljudskog genoma) čija je funkcija prerada i predočavanje antigena nalazi se u genskim regijama na kraćem kraku šestog kromosoma. Regija I. sadrži gene koji kodiraju molekule HLA -A, -B i -C, poznate i kao molekule HLA skupine I., koji se nalaze na površini svih stanica s jezgrom. Regija II. sadrži gene koji kodiraju molekule HLA -DR, -DQ i -DP, poznate i kao molekule HLA skupine II. koje se nalaze na površini antigen-prezentirajućih stanica kao što su makrofagi, limfociti B i dendritične stanice. Molekule HLA skupine I. predočuju unutarstanične antigene CD8<sup>+</sup> (engl. *clusters of differentiation*) citotoksičnim limfocitima T, dok molekule HLA skupine II. predočuju izvanstanične antigene CD4<sup>+</sup> pomoćnim limfocitima T, koji onda potiču proizvodnju odgovarajućih protutijela usmjerenih na navedene izvanstanične antigene. Određivanje gena i antigena polimorfnog sustava HLA (HLA-A, -B, -C, -DP, -DQ, -DR) iz periferne krvi ili limfnih čvorova naziva se „tipizacijom tkiva“. U pripremi za transplantacijsko liječenje provodi se tipizacija tkiva primatelja i darivatelja. Serološkim testom mikrolimfocitotoksičnosti ovisnim o komplementu – CDC (engl. *complement dependent cytotoxicity*) određuju se antigeni HLA, a za određivanje gena HLA koristi se metoda molekularne biologije temeljena na lančanoj reakciji polimerazom PCR (od engl. *polymerase chain reaction*). Za pokretanje imunološke reakcije odgovorni su antigeni darivatelja koji su nepoznati primatelju, stoga se u analizi HLA podudarnosti antigeni HLA darivatelja i primatelja analiziraju na razini nepodudarnosti – MM (od engl. *Mismatch*) za lokuse HLA-A, HLA-B i HLA-DR. Nepodudarnim se smatra onaj antigen koji je prisutan u darivatelja, a nije prisutan u primatelja te zbog toga može izazvati reakciju odbacivanja organa u primatelja. Broj nepodudarnosti na svakom od lokusa može iznositi od 0 do 2 (za sva tri lokusa ukupan broj mogućih nepodudarnosti je 6) (44).

Osim određivanja antigena i podudarnosti darivatelja i primatelja, potrebno je provjeriti prisutnost protutijela na HLA u serumu primatelja. Naime, do nastanka protutijela na HLA može doći pri transfuziji krvi ako je primatelj u životu već primio transplantirani organ te kod žena u trudnoći. U kliničkoj se praksi prisutnost protutijela na HLA određuje upotrebom tzv. panela limfocita koji se stvara tako da se izabere toliko prethodno HLA tipiziranih dobrovoljnih davatelja krvi koliko ih treba da njihovi aleli čine reprezentativni populacijski uzorak. Ovaj test naziva se „panel reaktivnih protutijela“, PRA (engl. *panel reactive antibodies*), a rezultat se izražava kao postotak. Potencijalni primatelji bubrega kojima

postotak PRA iznosi 0 – 5 % smatraju se neimuniziranima, oni s postotkom PRA 5 – 85 % imuniziranima, a oni s postotkom PRA većim od 85 % smatraju se visokoimuniziranim. Imunizirani bolesnici čine skupinu primatelja koja je pod većim rizikom od odbacivanja transplantiranog organa i zahtijevaju intenzivnu predtransplantacijsku i posttransplantacijsku imunološku skrb.

Posljednji predtransplantacijski test jest CDC test križne reakcije – CM (engl. *cross match*) u kojem se limfociti darivatelja dovode u kontakt sa serumom primatelja. Ako su protutijela na antigene HLA darivatelja (DSA) (engl. *donor specific antibodies*) prisutna u serumu primatelja, ona će se vezati za antigen na površini limfocita darivatelja, što nakon dodavanja komplementa uzrokuje razaranje membrane limfocita i njihovu smrt. Rezultat testa prikazuje se bodovnom ljestvicom od 1 do 8; 1 je negativna reakcija, 100 % živih limfocita, 8 je pozitivna reakcija, 100 % mrtvih limfocita. Negativan CM test uvjet je za transplantaciju bubrega, a pozitivan CM test apsolutna je imunološka kontraindikacija za transplantacijsko liječenje (44).

#### 1.2.3.3. Kirurški principi transplantacijskog liječenja

Prvi je korak kirurškog transplantacijskog liječenja eksplantacija bubrega iz tijela darivatelja. U živog darivatelja ona se može učiniti klasičnim, otvorenim kirurškim zahvatom, ali je poželjnije odabrati manje invazivne kirurške tehnike kao što su laparoskopska, laparoskopska rukom asistirana (engl. *hand-assisted*) ili robotska nefrektomija (45). Eksplantacija bubrega kod umrlog darivatelja obavlja se otvorenim kirurškim zahvatom, najčešće u sklopu višeorganske eksplantacije. Bez obzira na odabir kirurške metode, važno je osigurati pristup bubregu i mokraćovodu, pažljivo preparirati bubrežne krvne žile, očuvati perihilarno i periureteralno masno tkivo zbog arterijske cirkulacije mokraćovoda. Tijekom i nakon eksplantacije bubreg se hladi ledom i ispire hladnom kristaloidnom otopinom za prezervaciju kako bi se umanjio negativan učinak ishemije nakon prekida cirkulacije; optimalno je ohladiti bubreg na 4 °C. Ishemija dovodi do vakuolizacije i nekroze epitelnih stanica tubula nefrona, akutne tubularne nekroze i odgođene funkcije organa nakon transplantacije. Druga je posljedica ishemije pojačan izražaj gena odgovornih za aktivaciju limfocita T, kemotaksiju i staničnu apoptozu, što može dovesti do imunološke reakcije odbacivanja transplantiranog bubrega (46). „Topla ishemija“ traje od prekida cirkulacije u živog, odnosno od



kardiocirkulatornog aresta u umrlog darivatelja do uspostave perfuzije, a „hladna ishemija“ traje od uspostave perfuzije do transplantacije organa primatelju. Hlađenje bubrega ledom i hladnim perfuzijskim otopinama smanjuje metaboličku aktivnost stanica i njihovu potrebu za energijom, umanjujući ishemijske promjene (47).

Kristaloidne otopine za prezervaciju dijele se na one koje imaju sastav sličan unutarstaničnoj tekućini (*UW University of Wisconsin, EC Euro – Collins,*) i na one koje imaju sastav sličan izvanstaničnoj tekućini (*HTK histidin-triptofan-ketoglutarat, Celsior*). UW-otopina danas se smatra zlatnim standardom za čuvanje i perfuziju organa (48).

Donirani bubreg kirurški se implantira heterotopno u desnu ili lijevu ilijačnu jamu, ekstraperitonealno. Primatelj leži na leđima, uz položaj hiperekstenzije. Nakon pranja operativnog polja u mokraćni se mjehur postavi urinarni kateter. Rez na koži (Gibsonova incizija) duljine 20-ak centimetara počinje dva centimetra iznad izbočine na ilijačnoj kosti (*spina ilijaka anterior superior*) i nastavlja se do lateralne granice ravnog trbušnog mišića. Potom se prerežu vanjski kosi, unutarnji kosi te poprečni mišić trbušnog zida, pazeći da se ne ozlijedi peritonealna membrana i ne otvori peritonealna šupljina. Peritoneum s intraperitonealnim organima pomakne se medijalno. Slijedi identifikacija, podvezivanje, presijecanje i odstranjenje epigastričnih arterija koje su ogranci vanjskih i unutarnjih ilijačnih arterija zdjelice. Potom se prepariraju vanjske i unutarnje ilijačne vene i arterije, mobilizira se vanjska ilijačna vena, a ilijačne arterije mobiliziraju se minimalno da se ne ozlijedi adventicija arterijske stijenke. Prema duljini bubrežne arterije i vene, kao i planiranog položaja bubrega u ilijačnoj jami, odabiru se mjesta anastomoza krvnih žila transplantata i ilijačne vaskulature primatelja. Važno je odabrati ono mjesto koje osigurava da krvne žile ne budu pod tenzijom, ali i da ne budu preduge kako ne bi došlo do presavinuća, što može ugroziti cirkulaciju transplantiranog bubrega. Prvo se stvara venska anastomoza. Na vanjsku ilijačnu venu postavljaju se stezaljke proksimalno i distalno od mjesta anastomoze te se učini venotomija. Venska anastomoza izvodi se termino-lateralno, koristeći produžne šavove. Arterijska anastomoza može se učiniti termino-terminalno na unutarnju ilijačnu arteriju ili termino-lateralno na vanjsku ilijačnu arteriju ako se transplantira bubreg od preminulog darivatelja. Bubrežna arterija transplantata od umrlog darivatelja ima dio aorte oko utoka bubrežne arterije (*carrel patch*), što omogućuje lakše izvođenje anastomoze sa šavovima koji nisu odmah na ishodištu arterije, a to umanjuje rizik od postoperativne stenoze. Na unutarnju ili vanjsku ilijačnu arteriju postavljaju se stezaljke proksimalno i distalno od predviđenog

mjesta anastomoze. Arteriotomija se učini kranijalnije u odnosu na venotomiju (za vensku anastomozu) kako bi se osigurala bolja vidljivost pri zatvaranju anastomoze. Šavovi na anastomozi, pojedinačni ili produženi trebaju zahvatiti sve slojeve arterijske stijenke (49). Pažljivo stvaranje krvožilnih anastomoza najvažniji je korak u postizanju optimalne prokrvljenosti i funkcije transplantiranog organa. Ipak, kako temperatura bubrega raste nakon uklanjanja iz leda s 4 °C brzinom od 0,5 °C/minuti, trebalo bi težiti da vrijeme potrebno za anastomoziranje bude kraće od 30 minuta kako bi se ublažila neminovna ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (47).

Sljedeći važan korak kirurškog transplantacijskog zahvata jest anastomoza mokraćovoda i mokraćnog mjehura (ureterocistostomija) koja može biti transvezikalna i ekstravezikalna. Transvezikalna anastomoza (tip Leadbetter-Politano) stvara se na stražnjoj stijenci mokraćnog mjehura, a mjesto incizije jest iznad ušća nativnog mokraćovoda. Nakon incizije učini se tunel kroz stijenku mokraćnog mjehura kroz koji se provuče mokraćovod. Ekstravezikalna anastomoza (tip Lich-Gregoir) stvara se na lateralnoj strani verteksa mokraćnog mjehura. Poželjno je anastomozu učiniti antirefluksnom tehnikom stvaranja submukoznog tunela u stijenci mokraćnog mjehura (tehnika Pasini-Bradić). Mokraćovod se skрати da bi imao što izravniji tijek, ali bez tenzije na anastomozi. U anastomozu se implantira elastična, tanka teflonska proteza s dva savijena kraja „JJ“ proteza; gornji kraj proteze doseže pijelon transplantiranog bubrega, a donji mokraćni mjehur primatelja. „JJ“ proteza smanjuje učestalost kirurških komplikacija, posebice zastoja u otjecanju urina, ali i curenja urina tijekom cijeljenja šavova na anastomozi, ali povećava vjerojatnost infekcije. Zbog toga je preporuka uklanjanje proteze četiri tjedna nakon transplantacije (50).

#### 1.2.3.4. Imunosupresijski lijekovi u transplantacijskom liječenju

Ljudski imunološki sustav razlikuje vlastite stanice od stranih, stoga se kod presađivanja organa aktiviraju imunološke stanice, čije djelovanje može dovesti do neželjenog odbacivanja presađenog organa.

Patofiziologija odbacivanja transplantiranog organa temelji se na aktivaciji stanica i molekularnih medijatora primatelja nakon prepoznavanja organa genetički različitog darivatelja. Stanice koje se aktiviraju nakon transplantacijskog postupka jesu limfociti T i antigen-prezentirajuće stanice – APC (engl. *antigen presenting cells*), a to su makrofagi,

limfociti B i dendritične stanice. Nakon transplantacije darivateljeve antigene mogu predočavati darivateljski ili primateljevi APC-i. APC antigene darivatelja predočavaju limfocitima T, a predočavanje se odvija u slezeni i limfnim čvorovima. Ako antigene predočavaju darivateljevi APC-i, nastaje akutno odbacivanje, a predočavanje antigena od strane primateljevih APC-a odgovorno je za kronično odbacivanje presađenog organa (51).

Citotoksični CD8<sup>+</sup> limfociti T prepoznaju darivateljeve antigene HLA skupine I., koji su izraženi na svim stanicama s jezgrom, dok pomagački CD4<sup>+</sup> limfociti T prepoznaju darivateljeve antigene HLA skupine II. koji su fagocitirani, prerađeni i izloženi na površini limfocita B i makrofaga. Limfociti T prepoznaju predočeni antigen receptorom T-stanica TCR (engl. *T-cell receptor*,) uz interakcije kostimulacijskih molekula (CD28 na limfocitu T s CD80/86 na APC). Slijedi unutarstanična signalizacija koja dovodi do aktivacije transkripcijskih čimbenika i izražaja gena za citokine koji potiču limfocite T na aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju. Porast unutarstaničnog citoplazmatskog kalcija (Ca<sup>2+</sup>) aktivira kalcineurin koji dovodi do defosforilacije nuklearnog faktora aktiviranih limfocita T (NFAT). NFAT se premješta iz citoplazme u jezgru i potiče transkripciju gena za interleukin 2 (IL-2) koji se veže za receptore na površini stanice. Vezanjem na receptor aktivira se mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) – serin-treoninsku protein kinazu koja regulira sve faze staničnog ciklusa limfocita T. Osim najvažnijeg IL-2 u poticanju imunoreakcije na darivateljeve antigene sudjeluju citokini IL-4, IL-5 i IL-6, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), čimbenik nekroze tumora tumor alfa, TNF- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), koji aktiviraju limfocite B, njihovu diferencijaciju u plazma-stanice, proizvodnju protutijela i odlaganja imunokompleksa (kompleks antigen-protutijelo) u endotel vaskulature transplantiranog bubrega. Ova kaskada dovodi do aktivacije komplementa i koagulacijskog sustava, koji uzrokuju dodatna endotelna oštećenja te vaskularnu trombozu (52, 53).

Zbog njihove važne uloge u imunološkom odgovoru, primarni cilj imunosupresivskog liječenja u transplantacijskoj medicini jest supresija aktivacije i proliferacije limfocita. Više je skupina imunosupresivnih lijekova, različitog mehanizma djelovanja.

### Inhibitori kalcineurina

Kalcineurin je o kalciju Ca<sup>2+</sup> ovisna proteinska fosfataza, koja nakon aktivacije limfocita T i porasta Ca<sup>2+</sup> u citosolu aktivira NFAT koji posreduje u sintezi IL-2. Predstavnici ove skupine kemijski su različite molekule ciklosporin i takrolimus, koji se vezuju za proteine iz obitelji

imunofilina; ciklosporin se veže za ciklofilin, a takrolimus za FK-560 i tvore komplekse koji inhibiraju kalcineurin.

Ciklosporin također potiče izražaj gena za TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* ), snažnog inhibitora IL-2 potaknute proliferacije i sazrijevanja citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T (54). Takrolimus je znatno snažniji od ciklosporina u supresiji imunološkog odgovora pa posljednja dva desetljeća gotovo u potpunosti potiskuje ciklosporin iz imunosupresijskih protokola. Metaboliziraju se enzimom citokromom P450 3A u jetri i ulaze u interakciju s mnogobrojnim drugim lijekovima, dovodeći do različite bioraspoloživosti lijeka u organizmu. Oba lijeka imaju malu terapijsku širinu zbog čega je potrebno redovito praćenje koncentracije lijeka u krvi i prilagodba doze ovisno o izmjerenoj vrijednosti. Inhibitori kalcineurina predstavljaju srž imunosupresijskih protokola, ali imaju nefrotoksični učinak koji je djelomično uvjetovan dozom. Patogeneza nefrotoksičnosti i arterijske hipertenzije vazokonstrikcija je aferentnih arteriola s posljedičnom hipoperfuzijom glomerula i pogoršanjem funkcije transplantata. Ostale su nuspojave ovih lijekova hepatotoksičnost, hiperglikemija i hiperuricemija (55).

### mTOR inhibitori

mTOR član je obitelji fosfatidil-inozitol-3-kinaza koji regulira rast i proliferaciju stanica, ali i apoptozu. Inhibicija ovog unutarstaničnog puta dovodi do inhibicije citokinima uzrokovane proliferacije limfocita T i supresije imunološkog odgovora. Inhibitori mTOR-a jesu sirolimus i njegov derivat everolimus. Ovi lijekovi vežu se na imunofilin FK 506-12, čime nastaje aktivni kompleks koji blokira mTOR. Ne utječu na aktivaciju limfocita T, ali onemogućuju njihovu proliferaciju potaknutu IL-2. Oba lijeka uspješno blokiraju i proliferaciju limfocita B i stvaranje protutijela, a izazivaju i apoptozu dendritičnih stanica koje prezentiraju nevlastite antigene. Metabolizam lijekova odvija se preko enzima citokrom P450 3A i P-glikoproteina. Kao i inhibitori kalcineurina, pripadaju skupini lijekova male terapijske širine, doziraju se individualno uz praćenje koncentracije lijeka u krvi. Najčešće su nuspojave ovih lijekova ulceracije usne šupljine, upala sluznica, usporeno cijeljenje rana, hiperglikemija, dislipidemija, a mogu uzrokovati pneumonitis i tešku mijelosupresiju, osobito trombocitopeniju. Često izazivaju proteinuriju i periferne edeme koji mogu biti unilateralni (56).

### Mikofenolat mofetil (MMF)

MMF je predlijek koji se u organizmu brzo hidrolizira u aktivni oblik mikofenoličnu kiselinu MPA (engl. *mycophenolic acid*). Selektivno, nekompetitivno i reverzibilno inhibira enzim inozin monofosfat dehidrogenazu koji sudjeluje u sintezi gvanina neophodnog za sintezu deoksiribonukleinske kiseline, DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*). Kako limfociti T i B ne posjeduju enzime za alternativnu sintezu purina, oni ostaju u S-fazi staničnog ciklusa, uz nemogućnost proliferacije. Osim toga, MPA potiče apoptozu aktiviranih limfocita T, inhibira proizvodnju protutijela u aktiviranim limfocitima B i inhibira predočavanje antigena na dendritičnim stanicama. Metabolizam MPA odvija se glukuronidacijom, pomoću jetrene uridin difosfat-glukuronil transferaze. Nuspojave MPA ovisne su o dozi i uključuju poremećaje probavnog sustava u čak 30 % bolesnika: inapetencija, mučnina, povraćanje, proljevi i abdominalni bolovi. Ove nuspojave često su prolazne i većinom ne zahtijevaju prekid liječenja. Rijetko uzrokuju hipertenziju i mijelosupresiju, osobito neutropeniju. Povećavaju rizik nastanka oportunističkih infekcija, osobito virusnih (57).

### Glukokortikoidi

Dugi niz godina poznato je imunomodulacijsko djelovanje glukokortikoida, hormona koji se iz kolesterola sintetiziraju u zoni fascikulati kore nadbubrežne žlijezde. Zbog ovog djelovanja sintetizirani su glukokortikoidi koji se koriste kao lijekovi, a najčešće se primjenjuju prednizon i prednizolon (kratkog do srednje dugog djelovanja) te deksametazon i betametazon (dugog djelovanja). Ovi lijekovi smanjuju volumen i aktivnost limfnog sustava uzrokujući limfocitopeniju. Inhibiraju sintezu IL-2, IL-6 i IFN- $\gamma$ , potrebnih za proliferaciju i odgovor limfocita T na strane antigene. U velikim dozama smanjuju proizvodnju protutijela, a u manjim dozama oslabljuju stvaranje imunokompleksa (vezanje antigena i protutijela) i njihov prolazak kroz bazalnu membranu. Suprimiraju aktivaciju komplementa te potiču migraciju limfocita T iz intravaskularnog prostora u limfna tkiva. Metaboliziraju se u jetri. Nuspojave su mnogobrojne, metaboličke (poremećaj menstrualnog ciklusa, Cushingov sindrom, hiperglikemija, povećan apetit, porast tjelesne težine), gastrointestinalne (peptičke ulceracije), neurogene (glavobolja, vrtoglavica), dermatološke (petehije, strije, akne, hirsutizam, alopecija, usporeno cijeljenje rana) (55).

### Belatacept

Belatacept je fuzijski protein antigena 4 citotoksičnih limfocita T, CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) antigena i fragmenata domene Fc humanog imunoglobulina IgG1. Veže se na receptor CD80/CD86 na APC čime onemogućava aktivaciju limfocita T. Primjena belatacepta ima prednost u usporedbi s inhibitorima kalcineurina zbog povoljnijeg metaboličkog profila, manje incidencije *de novo* DSA, poboljšane funkcije transplantata i dugoročnog preživljenja bolesnika/transplantata. Nedostatak je nešto veća učestalost i intenzitet akutnih odbacivanja u prvoj godini nakon transplantacije i veća učestalost limfoproliferativnih bolesti, osobito u EBV seronegativnih primatelja (55, 57).

### Antilimfocitna protutijela

Pripravci antilimfocitnih protutijela mogu biti poliklonska i monoklonska protutijela. Poliklonska se dobivaju imunizacijom konja ili kunića ljudskim limfocitima T. Od poliklonskih protutijela uglavnom se koriste kunića poliklonska protutijela protiv humanih limfocita T (ALG) i kunića poliklonska protutijela protiv humanih timocita (ATG). Imunosupresijski učinak posljedica je deplecije limfocita T u krvi i limfnim tkivima i supresije staničnog imunološkog odgovora, dok humoralna imunost (posredovana protutijelima) ostaje sačuvana. Poluvijek života poliklonskih kunićjih protutijela iznosi tri dana, a toksični učinci uključuju sindrom oslobađanja citokina (povišena tjelesna temperatura, hipotenzija, glavobolja, dispneja), trombocitopeniju, limfopeniju te veliki rizik za reaktivaciju CMV-a.

Monoklonska protutijela mogu biti deplecijska ili nedeplecijska. Deplecijsko monoklonsko protutijelo jest alemtuzumab, a nedeplecijska basiliksimab i daklizumab.

Alemtuzumab je humanizirano monoklonsko protutijelo koje se veže na receptor CD52 na limfocitima T i B, ali i na makrofagima i monocitima. Neželjena je nuspojava liječenja alemtuzumabom znatna leukopenija. Postoje izvješća o akutnim odbacivanjima posredovanim protutijelima od primjene alemtuzumaba, pojavi autoprotutijela ili autoimunih bolesti kod ponovljenih primjena, poput imunotrombocitopenije, hemolitičke anemije i poremećaja funkcije štitne žlijezde.

Basiliksimab (kimerično monoklonsko protutijelo klase imunoglobulina G1-IgG1) i daklizumab (humanizirano monoklonsko protutijelo klase IgG1) protutijela su na receptor za

IL-2 na limfocitu T. Receptor za IL-2 sastoji se od alfa, beta i gama lanca. Basiliksimab i daklizumab vezuju se visokim afinitetom za alfa-lanac (CD25) receptora, čime onemogućuju vezanje IL-2 za svoj receptor, što dovodi do smanjenja proliferacije limfocita T. Za razliku od poliklonskih protutijela i alemtuzumaba, ovi lijekovi ne uzrokuju depleciju limfocita T nego moduliraju njihov odgovor na podražaj antigenom. Poluvrijeme uklanjanja basiliksimaba iznosi sedam dana, a supresija receptora za IL-2 traje tri do četiri tjedna, dok daklizumab ima poluvrijeme uklanjanja dvadeset dana, a supresija receptora za IL-2 traje deset tjedana. Ovi lijekovi imaju malu učestalost štetnih učinaka, uz mogućnost nastanka reakcije preosjetljivosti (češće uz basiliksimab), ali se ne može isključiti veći rizik za limfoproliferativne poremećaje (55).

Imunosupresijsko liječenje sprečava odbacivanje transplantiranog organa i zaslužno je za uspješnost transplantacije. Indukcijsko imunosupresijsko liječenje primjenjuje se pred/perioperativno, a imunosupresijska terapija održavanja primjenjuje se postoperativno u dugom periodu, dokle god traje funkcija presađenog organa. Cilj je indukcijske terapije smanjenje ranog odbacivanja transplantiranog bubrega. Primjenjuju se poliklonska ili monoklonska protutijela kojima se izrazito suprimira imunološki odgovor primatelja protiv transplantata. Iako je primjena indukcijske imunosupresijske terapije standardna u transplantacijskom liječenju, njezina je najveća dobrobit kod bolesnika s visokim imunološkim rizikom kao što su primatelji organa darivatelja po proširenim kriterijima (41), darivatelja s nekucajućim srcem, senzibiliziranih bolesnika (osobito onih s PRA > 50 %) ili kod ponavljanih transplantacija (36).

Imunosupresijska terapija održavanja uključuje više lijekova. Princip istovremene primjene više skupina lijekova bazira se na njihovu aditivnom učinku različitim mehanizmima djelovanja. U imunosupresijskim protokolima, koji nisu jedinstveni za sve transplantacijske centre u svijetu pa ni u Hrvatskoj, okosnica su inhibitori kalcineurina ciklosporin i takrolimus. Najčešće se primjenjuju u kombinaciji s jednim ili dva lijeka iz drugih skupina imunosupresijskih lijekova. To su MMF i kortikosteroidi. U odabраниh skupina bolesnika s malignim bolestima ili nuspojavama inhibitora kalcineurina primjenjuju se inhibitori mTOR (sirolimus ili everolimus). Kombinacija različitih imunosupresijskih lijekova omogućuje individualizaciju imunosupresijske terapije ovisno o obilježjima primatelja i darivatelja, ali i nuspojavama lijekova. Redovitim praćenjem koncentracije imunosupresijskih lijekova (inhibitori kalcineurina, inhibitori mTOR) prilagođava se njihova doza. Rizik odbacivanja

transplantata ovisi o ukupnoj razini izloženosti primatelja organa imunosupresijskim lijekovima. Početne visoke doze imunosupresijskih lijekova mogu se postupno snižavati ovisno o ukupnom transplantacijskom imunološkom riziku, nastanku nuspojava i komplikacijama u kasnijem posttransplantacijskom periodu (54, 55).

#### 1.2.3.5. Komplikacije transplantacijskog liječenja

Neželjeni događaji u transplantacijskom liječenju komplikacije su povezane s kirurškim zahvatom, odbacivanje transplantata i infekcije.

##### Kirurške komplikacije

Kirurške komplikacije nakon transplantacije mogu biti vaskularne (1 – 15 %) i urološke (3 – 9 %). Vaskularne su komplikacije krvarenje, hematoma, tromboza renalne vene i arterije, stenoza renalne arterije, limfokela, arterijsko-venska fistula i pseudoaneurizma. Dijagnosticiraju se ultrazvučnim pregledom (UZV) uz primjenu Doppler tehnike za analizu toka krvi kroz krvne žile, kompjutoriziranom tomografijom (CT), magnetskom rezonancom (MR) s angiografijom ili bez nje (58).

Krvarenja, hematomi i tromboze nastaju u ranom posttransplantacijskom periodu. Tijekom samog zahvata može doći do jačeg i/ili produženog krvarenja, a krvarenje se može javiti i poslije, prvih nekoliko dana nakon zahvata. Znatna krvarenja koja zahtijevaju kiruršku reviziju najčešće nastaju na vaskularnim anastomozama. Tromboza renalne arterije javlja se u 1 % bolesnika, a nastaje zbog oštećenja intime bubrežne arterije ili njezina presavinuća i rotacije. Tromboza bubrežne vene najčešće nastaje zbog pritiska izvana, krvarenjem ili hematoma, ali može nastati zbog tromboze ilijačnih krvnih žila, s progresijom tromba u venu transplantiranog bubrega. Klinički se vidljiva prestankom mokrenja i jakim boli u transplantiranom bubregu. Tromboze zahtijevaju hitan kirurški zahvat koji najčešće završava odstranjenjem transplantata (grafektomija). Stenoza bubrežne arterije javlja se u 10 % transplantiranih, najčešće od tri mjeseca do dvije godine nakon transplantacije. Klinička je manifestacija terapijski rezistentna arterijska hipertenzija uz pogoršanje funkcije transplantiranog bubrega. Terapija izbora perkutana je transluminalna angioplastika (PTA); proširenje arterije balonom na napuhivanje uz umetanje mrežaste metalne potpornice („stent“) ili bez nje. Limfokela je nakupina limfe oko presađenog bubrega koja potječe iz bolesnikovih



zdjelčnih limfnih žila, manjim dijelom i od limfnih žila transplantata. Učestalost je 1 – 20 %, pojavljuje se šest tjedana nakon transplantacije. Manje limfokete (veličine do nekoliko centimetara) ne uzrokuju tegobe i zahtijevaju UZV praćenje, a velike (deset centimetara i više) komprimiraju transplantirani organ, krvne žile i mokraćovod, mogu uzrokovati proširenje kanalnog sustava iznad mjesta opstrukcije, ali i trombozu bubrežne arterije i/ili vene. Metode liječenja limfokete aspiracija su pod kontrolom UZV-a, perkutana drenaža ili kirurška marsupijelizacija. Arterijsko-venske fistule (AVF) nastaju kod istodobnog oštećenja bubrežne arterije i pripadajuće vene kod biopsije transplantiranog bubrega, a kod pseudoaneurizme oštećenje se nalazi samo na bubrežnoj arteriji. AVF zahtijevaju intervenciju kad uzrokuju znatno krvarenje, a pseudoaneurizme ako su veće od dva centimetra; može se učiniti embolizacija, endovaskularni ili otvoreni kirurški zahvat.

Urološke su komplikacije opstrukcija kanalnog sustava transplantiranog bubrega i curenje urina. Opstrukcija (2 – 10 % bolesnika) može nastati u bilo kojem dijelu kanalnog sustava transplantiranog bubrega. Nastaje zbog pritiska izvana (hematomom, limfokelom) ili zbog nastanka kamena ili krvnog ugruška unutar kanalnog sustava. Uzrok opstrukcije može biti i ishemija i posljedična striktura mokraćovoda ili presavinuće (predugog) mokraćovoda. Kako je transplantirani bubreg denerviran, bolesnik neće imati tipične bubrežne kolike, ali može imati hematuriju i/ili oskudniju diurezu. U ranom posttransplantacijskom periodu može doći do curenja urina (5 % bolesnika) iz anastomoze mokraćovoda i mokraćnog mjehura zbog usporenog cijeljenja ili zbog ishemije i nekroze mokraćovoda. Urin se može nakupljati u postoperativnom području i formirati urinom ili može istjecati van, kroz postoperativnu ranu. Biokemijska analiza perkutane punkcije nakupljene tekućine oko transplantiranog bubrega nužna je za razlikovanje urinoma od limfokete. Klinički se urinom manifestira oteklinom i bolom. Terapijske opcije kod opstrukcije kanalnog sustava transplantiranog bubrega i kod urinoma postavljanje su „JJ“ proteze i/ili perkutana nefrostomija, a u slučaju neuspjeha navedenih opcija nužan je otvoreni kirurški zahvat (59).

#### Odbacivanje transplantiranog bubrega

Odbacivanje transplantiranog organa može biti hiperakutno (unutar 24 sata od transplantacije), akutno (unutar nekoliko dana do nekoliko tjedana nakon transplantacije) ili kronično (više mjeseci ili godina nakon transplantacije). Hiperakutno odbacivanje uzrokovano je već postojećim protutijelima primatelja na antigene darivatelja, a odvija se aktivacijom

sustava komplementa koje uzrokuje trombozu malih krvnih žila i posljedični infarkt transplantata. Postalo je rijetko (1 %) zahvaljujući unapređenju imunološkog predtransplantacijskog probira. Bolesnik ne mokri ili mokri vrlo oskudno, a CD-UZV-om ne može se dokazati protok krvi kroz transplantat. Jedino je djelotvorno liječenje kirurško uklanjanje transplantata (graftektomija) (52, 53).

Akutno odbacivanje može biti posredovano limfocitima T („stanično“), protutijelima („humoralno“), ali i kombinirano. Citotoksični CD8<sup>+</sup>limfociti T i pomagački CD4<sup>+</sup> limfociti T proizvodnjom citokina aktiviraju staničnu imunost ili pak potiču proizvodnju protutijela i aktiviraju humoralnu imunost. Iako mu je učestalost znatno smanjena uvođenjem indukcijske imunosupresijske terapije, oko 20 % primatelja bubrega ima jednu ili više epizoda odbacivanja. Akutno odbacivanje često ima asimptomatski tijek, a porast razine serumskog kreatinina nespecifičan je pokazatelj. Kod sumnje na akutno odbacivanje treba isključiti vaskularne ili urološke komplikacije kao što su tromboza krvnih žila transplantata (javlja se u 1% primatelja, uglavnom uzrokuje ireverzibilni gubitak transplantata), razvoj urinoma, hematoma, apscesa, limfokele (60, 61). Ultrazvučnim pregledom vidljivo je uvećanje transplantiranog bubrega zbog edema. Akutno odbacivanje i patogenetska osnova njegova nastanka (stanično ili humoralno) potvrđuju se patohistološkom analizom bioptata transplantata, a klasificira se prema Banff klasifikaciji (62).

Stanični tip reakcije odbacivanja (posredovan limfocitima T) karakterizira intersticijski infiltrat mononuklearnim stanicama, tubulitis i arteritis. Odbacivanje posredovano protutijelima (koje proizvode limfociti B) karakterizira intimalni ili transmuralni arteritis i trombotska mikroangiopatija. Dokaz svježije interakcije protutijela s vaskularnim endotelom pozitivno je bojenje na komponentu komplementa C4d u stijenci peritubularnih kapilara. Dijagnozu humoralnog odbacivanja potvrđuje laboratorijski imunološki test pozitivnih DSA u serumu primatelja. Razlikovanje staničnog odbacivanja i odbacivanja posredovanog protutijelima važno je zbog terapijskog pristupa. Akutno stanično odbacivanje liječi se velikim dozama kortikosteroida (tzv. bolusi) ili antitimocitnim globulinom. Liječenje akutnog odbacivanja posredovanog protutijelima zahtijeva dodatno liječenje terapijskom izmjenom plazme i intravenskim imunoglobulinom. Akutno odbacivanje kompromitira daljnju funkciju transplantata jer teško oštećeni dijelovi transplantata cijele fibrozom. Nužno je intenzivirati imunosupresijsku terapiju da se spriječe nove epizode akutnog odbacivanja s posljedičnim

povećanim rizikom za infekcije, metaboličke komplikacije i nastanak zloćudnih bolesti u primatelja (52).

Kronično odbacivanje transplantiranog organa događa se tiho, sporo, tijekom godina nakon transplantacije. Laboratorijski i klinički očituje se postupnim porastom kreatinina u serumu primatelja, pojavom proteinurije, lošije reguliranom arterijskom hipertenzijom. Kronično odbacivanje transplantata posredovano *de novo* sintetiziranim DSA-om histološki je obilježeno fibrozom intime arterija te multilameliranjem bazalnih membrana peritubularnih kapilara (vidljivo elektronskim mikroskopom). Patognomonične patohistološke promjene u kroničnom staničnom odbacivanju transplantata promjene su na arterijama; intimalna infiltracija mononukleara, proliferacija VSMC (engl. *vascular smooth muscle cells*) u mediji i njihova infiltracija u intimu uz suženje i okluziju arterijskog lumena (kronična arteriopatija transplantata). Ove promjene dovode do ishemije i fibroze transplantata. Kronično odbacivanje podmuško napreduje unatoč imunosupresijskoj terapiji; specifične terapijske strategije nema, osim intenziviranja imunosupresijskog liječenja ako je moguće (62).

### Infekcije

Primarni je cilj transplantacijske medicine održati razinu imunosupresijske terapije kojom se sprečava odbacivanje organa uz smanjivanje rizika infektivnih komplikacija na najmanju moguću mjeru. Infekcije su najučestalije u prvoj godini nakon transplantacijskog liječenja kada je i neto imunosupresija visoka. Razlikujemo infekcije podrijetlom od darivatelja, od samog primatelja, bolničke infekcije te infekcije koje se razvijaju uslijed izlaganja u zajednici. Uzročnici infekcija povezanih s darivateljem jesu bakterije i gljivice (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Candida*) koje uzrokuju bakterijemiju u vrijeme eksplantacije organa jer se ovi uzročnici mogu pričvrstiti na vaskularne i ureteralne anastomoze te uzrokovati nekrozu i dehiscijenciju anastomoza, mikotične aneurizme i curenje urina. Virusni „miraz“ darivatelja mogu biti CMV, EBV, BK poliooma virusi, ali i *Mycobacterium tuberculosis*. Infekcije mogu nastati reaktivacijom latentnih infektivnih žarišta u primatelja uzrokovanih mnogobrojnim mikroorganizmima: *Mycobacterium tuberculosis*, CMV, HSV, VZV, HBV, HCV (63).

Etiološki su najčešće bakterijske infekcije, i to infekcije mokraćnog sustava sa sekundarnom bakterijemijom, rjeđe infekcije rane i pneumonije. Najčešći su uzročnici uroinfekcija bakterije *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*

i*Enterobacter*, a najčešći su uzročnici infekcija rane *Staphylococcus epidermidis* i *aureus* te *Pseudomonas aeruginosa* (64).

Kolonizacija bolničkim (nozokomijalnim) mikroorganizmima tijekom hospitalizacije i razvoj infekcije mikroorganizmima rezistentnim na antimikrobno liječenje učestalije su u bolesnika s početno lošijom funkcijom transplantata, kirurškim komplikacijama i duljom urinarnom kateterizacijom. Infekcije iz opće zajednice vezane su za konzumiranje kontaminirane vode i hrane, kontakte s bolesnim članovima obitelji ili radne sredine. U prvom mjesecu nakon transplantacije većina infekcija uzrokovana je nozokomijalnim bakterijama te bakterijama prenesenim od darivatelja. Od drugog do šestog mjeseca nakon transplantacije javljaju se virusne (re)infekcije – CMV, HSV, HBV, HCV, oportunističke infekcije koje uzrokuju *Pneumocystis carini*, *Toxoplasma gondii*, *Aspergillus*, *Nocardia* te relapsne bakterijske infekcije. Od šestog mjeseca do godine dana nakon transplantacije bakterijske infekcije (perzistirajuće i/ili relapsirajuće) učestalije su u primatelja s lošijom funkcijom transplantata i onih koji su liječeni zbog epizoda odbacivanja. Prepoznavanje infekcije u bolesnika s transplantiranim bubregom teže je nego kod bolesnika s urednim imunološkim odgovorom jer su klinički i laboratorijski znakovi infekcije blaži zbog imunosupresijske terapije. Važno je uzeti uzorke krvi, urina, obriske postoperativne rane za mikrobiološku analizu, zbog identifikacije patogena, ali i zbog optimalnog antimikrobnog liječenja. Prvi je terapijski korak redukcija imunosupresije i uključenje široke antimikrobne terapije, antibakterijske i antivirusne, koja se deeskalira po dospijeću mikrobioloških nalaza. Iako je učestalost infekcija vidno smanjena posljednjih desetljeća, one i dalje ostaju znatan uzrok pobolijevanja i smrtnosti u bolesnika nakon transplantacije bubrega. Virusne infekcije mogu potaknuti akutno odbacivanje, a povezuju se i s nastankom zloćudnih tumora (63).

Očekivano preživljenje bolesnika i transplantiranog bubrega u prvoj godini nakon transplantacije je 90 – 100 %. Rizik od smrti bolesnika s transplantiranim bubregom upola je manji od rizika bolesnika koji se liječe dijalizom. Iako bolesnici s funkcionalnim transplantatom imaju duži životni vijek od onih koji nadomještaju bubrežnu funkciju HD-om ili PD-om, on je još uvijek kraći nego u općoj populaciji iste dobi (65).

### 1.3. ODGOĐENA FUNKCIJA TRANSPLANTIRANOG BUBREGA

Odgođena funkcija transplantata – DGF (engl. *delayed graft function*) oblik je akutnog zatajivanja transplantiranog bubrega karakteriziran poslijetransplantacijskom oligurijom i nedostatnom depuracijom dušičnih supstanci. Definira se nužnošću dijalize dulje od sedam dana nakon transplantacije (66, 67). Incidencija iznosi do 10 % kada se transplantira bubreg živog darivatelja, a znatno je veća (19 – 40 %) kada se transplantira bubreg darivatelja nakon moždane smrti (68 – 70).

Odgođena funkcija transplantata – DGF neželjeni je događaj u transplantacijskom liječenju. Povećava rizik za akutno odbacivanje, razvoj fibroze i lošiju kratkoročnu i dugoročnu funkciju transplantiranog bubrega (71 – 73). Mnogobrojni čimbenici utječu na njezinu pojavnost, a povezani su s karakteristikama darivatelja, primatelja, antigenskom podudarnosti i trajanjem hladne ishemije. Velik fokus istraživanja u transplantacijskoj medicini čimbenici su darivatelja koji negativno utječu na rani (i kasni) transplantacijski ishod. To su veća dob, muški spol, veći indeks tjelesne mase – BMI (engl. *body mass index*), cerebrovaskularni incident kao uzrok moždane smrti, anamneza arterijske hipertenzije, šećerne bolesti, povišena predeksplantacijska razina serumskog kreatinina, hemodinamska nestabilnost i primjena inotropa u predeksplantacijskom periodu (74).

Dobro su istraživani i čimbenici primatelja koji negativno utječu na transplantacijski ishod: veća dob, arterijska hipertenzija, kardiovaskularne bolesti, duljina liječenja dijalizom (66, 75). Ozljeda i posljedična disfunkcija endotelnih stanica s razvojem vaskularnih kalcifikata u miljeu kronične upale u uremiji često je zastupljena u primatelja bubrega i pridonosi ishemijskom i imunološkom oštećenju transplantata (76).

Hladna ishemija vrijeme je koje organ provodi ohlađen, između prestanka krvne opskrbe u tijelu darivatelja (eksplantacija) i uspostave krvne opskrbe nakon formiranja vaskularnih anastomoza u kirurškom postupku transplantacije (77). Za vrijeme hladne ishemije provodi se hipotermija, kojoj je cilj održati vitalnost bubrega. Iako snižavanje temperature usporava metabolizam stanica, hladnoća ne može zaustaviti ni spriječiti stanična oštećenja zbog prekida krvne opskrbe. Mnogim istraživanjima pokušala se dokazati povezanost trajanja hladne ishemije i DGF-a, ali bez jedinstvenog zaključka. Dio istraživanja definira dulju hladnu ishemiju kao jasan rizični čimbenik za DGF (78), ali druga istraživanja nisu potvrdila ovu povezanost (70, 79, 80). Općenito je prihvaćeno da kraća hladna ishemija ima povoljan učinak

na poslijetransplantacijski tijek, a iako još nije jasna vremenska granica kada taj učinak nestaje, izgledno je da bi trebalo težiti hladnoj ishemiji kraćoj od 24 sata (81).

Patofiziološka podloga DGF-a najčešće je akutna tubularna nekroza, rjeđe progresivna reakcija odbacivanja superponirana na akutnu tubularnu nekrozu, opstrukcija mokraćnog sustava, a vrlo rijetko tromboza renalne arterije/vene (82).

Akutna tubularna nekroza posljedica je ishemijsko-reperfuzijske ozljede u transplantacijskom postupku. Zbog privremenog prekida krvne opskrbe bubrega nastaje kraća (živi darivatelji) ili dulja (darivatelji nakon moždane smrti) hipoksija (83). Kao odgovor na hipoksiju u mitohondrijima tubularnih stanica eksplantiranog bubrega povećava se produkcija reaktivnih spojeva kisika, ROS (engl. *reactive oxygene species*). Budući da je kisik potreban u proizvodnji adenozin-trifosfata (ATP), količine tog važnog energetskog spoja u ishemiji se nadoknađuju procesom anaerobne glikolize uz nastajanje mliječne kiseline. Nakupljanje mliječne kiseline u stanici dovodi do acidoze, nestabilnosti lizosoma i aktivacije njihovih enzima. Kada se i ako potroše zalihe supstrata za anaerobnu glikolizu, dolazi do manjka ATP-a, posljedica je inaktivnost Ca i Na/K ATP-azne pumpe, što dovodi do unutarstaničnog nakupljanja natrija, vode i kalcija. Preopterećenje stanica kalcijem i stanični edem dovode do oštećenja staničnih struktura te neprogramirane stanične smrti – nekroze. Konačna i biološki teža faza ozljede javlja se tijekom reperfuzije nakon transplantacijskog postupka. Naglo nastala oksigenacija mijenja stanični milje, a naglom promjenom staničnog pH povećava se proizvodnja ROS-a (84).

Oksidativna modifikacija dušikova oksida (NO), važnog modulatora vaskularnog tonusa endotelnog podrijetla, dovodi ne samo do njegove smanjene bioraspodjelivosti već i do stvaranja toksičnih produkata koji dodatno oštećuju stanicu (85). Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda uzrokuje i aktivaciju imunološkog sustava aktivacijom receptora sličnih Tollu, TLR (engl. *Toll-like receptor*), dendritičnih stanica te sustava komplementa. TLR su proteinski receptori koji posreduju u prepoznavanju molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem stanice, DAMP (engl. *damage-associated molecules patterns*) te aktiviraju adapterske proteine poput čimbenika diferencijacije mijeloidnih stanica (MyD88) i molekule TRIF (engl. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*), koji pokreću prijenos signala u jezgru i aktiviraju molekule iz skupine aktivatora transkripcije staničnih gena poput NF-κB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), IRF (engl. *interferon regulatory factors*) 3 i 7 i/ili MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*). Na taj način

TLR reguliraju izražaj gena koji kodiraju sintezu interferona klase I, II i III, proupalnih, imunoregulacijskih te protuupalnih citokina koji omogućuju započinjanje nespecifične imunološke reakcije. Aktivirane dendritične stanice predaju antigene transplantata limfocitima T primatelja, a potom interakcija između limfocita T i B može potaknuti različite aloimune odgovore. Aktivirani komplement izaziva povećanu sintezu upalnih citokina IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\beta$  koji mogu uzrokovati programiranu smrt stanice, apoptozu (67, 84).

Tubularne epitelne stanice najosjetljivije su na ishemijsku ozljedu, a reperfuzijska ozljeda dovodi do edema endotelnih stanica kapilara glomerula i kongestije peritubularnih kapilara. Patohistološkim nalazom bioptata transplantata s DGF-a prevladava tubularno oštećenje, kongestija peritubularnih kapilara, gubitak četkaste površine na apikalnoj membrani epitela proksimalnih tubula, velike citoplazmatske vakuole u epitelnim stanicama proksimalnih i distalnih tubula (znak stanične autofagije), prisutnost cilindara u distalnim tubulima (znak opsežne epitelne nekroze). Intersticij je edematozan, uz pokoju mononuklearnu upalnu stanicu. Arhitektura glomerula nije poremećena, prisutan je edem endotelnih stanica, a rjeđe se vide trombi u glomerularnim kapilarama (86).

Nakon kirurške anastomoze arterije i vene transplantata s ilijačnom arterijom i venom primatelja ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, uz arterijsku hipotenziju i hipovolemiju zbog vazodilatacije nakon primjene anestetika i otpuštanja citokina primjenom indukcijske imunosupresije, uzrokuju hipoperfuziju aferentnih arteriola nefrona. Hipoperfuzija dovodi do oštećenja endotelnih stanica kapilara glomerula, smanjenja ukupne filtracijske površine te smanjenja GFR-a i nedostatnog volumena urina. Ako se reperfuzija ne uspostavi ili se uspostavi zakašnjelo, slijedi i hipoperfuzija kapilara tubula i oštećenje epitelnih tubularnih stanica, njihova nekroza te odlaganje u tubule što znatno usporava ili potpuno zaustavlja protok urina (87, 88). Klinički nastaje oligurija, laboratorijski perzistira azotemija zbog nedostatne depuracije razgradnih produkata proteina ureje i kreatinina. U optimalnom slučaju ishemijsko-reperfuzijska ozljeda u transplantaciji bubrega reverzibilna je promjena koja uzrokuje oliguriju u ranom poslijeoperacijskom razdoblju, a u neoptimalnom slučaju može potrajati dulje i zahtijeva suportivno liječenje dijalizom.

Predviđanje i prevencija DGF-a može poboljšati ishode transplantacije i upravo je zato važno istraživati rizične čimbenike i okolnosti koje povećavaju njezinu učestalost. U cilju ranog prepoznavanja ishemijsko-reperfuzijske ozljede i posljedično DGF-a istražuju se potencijalni dijagnostički biomarkeri u primatelja, ali i darivatelja. Prospektivna studija koja je uključila

mnogobrojne transplantacijske centre u SAD-u pokazala je da su više razine biomarkera tubularnog oštećenja NGAL-a (engl. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) i IL-18 u urinu primatelja prvog dana nakon transplantacije povezane s većom učestalosti DGF-a. Povišene razine monocitnog kemoatraktantnog proteina 1-MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein*), snažnog kemoatraktanta za monocite i makrofage, u urinu primatelja, ali i darivatelja nakon moždane smrti povezane su s DGF-om (67).

Prevenција DGF-a uključuje optimalno zbrinjavanje potencijalnog darivatelja nakon moždane smrti. Primjena umjerene hipotermije darivatelja znatno je umanjila stopu DGF-a (s 39 % na 28 %) (67). Treba težiti kraćem vremenu hladne ishemije uz optimalnu perfuziju bubrega nakon eksplantacije. Istraživanja pokazuju da primjena hipotermijske strojne perfuzije smanjuje učestalost i intenzitet DGF-a (84).

Provode se mnogobrojna istraživanja na staničnim i životinjskim modelima o terapijskim opcijama ublažavanja ishemijsko-reperfuzijske ozljede, ali do danas ne postoji službeno odobrena i registrirana terapija. Tijekom faze ishemije energetski se metabolizam prebacuje s oksidacije masnih kiselina na glikolizu, omogućujući stanicama i tkivima da ostanu održivi. Ovo preusmjeravanje energetskog metabolizma kontrolira i poboljšava inducibilni faktor hipoksije, HIF (engl. *hypoxia-inducible factor*), čiju stabilnost reguliraju o kisiku ovisni enzimi prolil-hidroksilaze, PHD (engl. *prolyl hydroxylase domain enzymes*). Liječenje farmakološkim dozama inhibitora PHD dovodi do povećane dostupnosti HIF-a u stanicama i bolje tolerancije bubrega na ishemiju (85). Ohrabruju podatci o primjeni protutijela na komponentu komplementa C5 te inhibitora IL-6 kako bi se ograničila stanična apoptoza (67). Odgođena funkcija transplantata – DGF komplikacija je koja se često javlja u početnom razdoblju nakon transplantacije. Osim akutnih komplikacija zbog nefunkcionalnosti transplantata praćenih produljenom hospitalizacijom, rizikom nozokomijalnih infekcija, DGF je povezan i s kroničnom disfunkcijom transplantata. Transplantacijska medicina suočena je sa starenjem stanovništva opterećenog sve većim brojem bolesti i potencijalnih darivatelja i primatelja organa. Vjerojatno je to razlog što poboljšanja u cjelokupnoj skrbi darivatelja i primatelja nisu smanjila učestalost DGF-a u mjeri u kojoj bi to bilo očekivano (73, 89, 90).

#### 1.4. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI



Koštani morfogogenetski proteini – BMP (engl. *bone morphogenetic protein*) multifunkcionalni su čimbenici rasta koji pripadaju (nad)obitelji signalnih molekula TGF- $\beta$ .

Kod ljudi obitelj TGF- $\beta$  sastoji se od 33 gena liganda (TGF- $\beta$ , aktivini, BMP, hrskavični morfogogenetski proteini – CDMP, engl. *cartilage derived morphogenetic proteins*), dva čimbenika rasta i diferencijacije (GDF, engl. *growth and differentiation factor*), sedam receptora tipa I, (ALK1–7; engl. *activin receptor-like kinase*), pet receptora tipa II (ActRIIA, ActRIIB, BMPRII, TGF $\beta$ RII i AMHRII), kao i niz koreceptora, regulatora i unutarstaničnih transkripcijskih čimbenika SMAD (naziv Smad kombinacija je *Drosophila* gena engl. *mothers against decapentaplegic* – Mad i engl. *small protein Caenorhabditis elegans* – Sma). Posebna značajka obitelji jest promiskuitet njegovih članova; ligandi se mogu vezati na više različitih receptora, a receptori mogu vezati više liganada. Evolucijski očuvana obitelj TGF- $\beta$  regulira mnoge fiziološke procese u embriogenezi i homeostazi odraslih tkiva, ali sudjeluje i u patofiziološkim procesima poremećaja funkcije mnogih organa i nastanku bolesti (91).

Djelovanje BMP-ova, proteina odgovornih za poticanje rasta kosti, prvi je put zamijećeno 1965. godine (92), no ostali su nepoznati sve do pročišćavanja i sekvencioniranja goveđeg BMP-3 (osteogenin) te kloniranja ljudskih BMP-2 i 4 u kasnim 1980-ima (93). Marshall Urist davne 1965. godine pokazao je da ekstrakt kosti može potaknuti nastanak kosti u mišićnom tkivu štakora te je postavio hipotezu da u koštanom matriksu postoji bioaktivni čimbenik odgovoran za osteogenezu (92). Istraživanja devedesetih godina prošlog stoljeća koja su uslijedila nakon pročišćavanja i kloniranja BMP-ova pokazala su da BMP-ovi u nekoštanim tkivima potiču diferencijaciju osteogenih progenitorskih stanica u osteoblaste koji stvaraju kost bez prisustva osteoklasta (94).

Identificirano je više od dvadeset BMP-ova i podijeljeno u sljedeće četiri skupine: BMP-2/4, BMP-5/6/7/8a/8b, BMP-9/10 i BMP-12/13/14 na temelju njihove funkcije i analize aminokiselinskog slijeda. BMP-2 i BMP-4 podudarni su u 92 % aminokiselinskog slijeda, imaju najjaču osteoinduktivnu aktivnost. BMP-5, BMP-6 i BMP-7 imaju podudarnost aminokiselinskog slijeda oko 89 %. BMP-3 je klasificiran u zasebnu skupinu. Iako ne pokazuje jasnu osteoinduktivnu aktivnost, dijeli strukturnu sličnost s BMP-7 u 42 % aminokiselinskog slijeda. Za BMP-1 ispostavilo se da nije srodan ostalim BMP-ovima te ne pripada TGF- $\beta$  nadobitelji već skupini prokolagen-C-proteinaza te svojom aktivnosti regulira pretvorbu prokolagena u zreli kolagen. Geni koji kodiraju BMP-ove široko su rasprostranjeni u ljudskom genomu, što je doprinijelo razvoju tkivno-specifičnih učinaka pojedinih članova obitelji. Geni za BMP-2 i BMP-7 smješteni su na 20. kromosomu, za BMP-3 na 4.

kromosomu, BMP-4 na 14. kromosomu, BMP-5 i BMP-6 na 6. kromosomu, a BMP-8 na 1. kromosomu (95).

Iako prvotno otkriveni kao proteini koji potiču stvaranje kosti u koštanom i nekoštanom tkivu (čemu zahvaljuju svoje ime), mnoga istraživanja koja su uslijedila pokazala su da BMP-ovi imaju ulogu u diferencijaciji, proliferaciji, ali i apoptozi različitih fenotipova mezenhimskih stanica. Tijekom embriogeneze BMP-ovi doprinose razvoju tkiva i organa koji nastaju mezenhimsko-epitelnim međudjelovanjem; utječu na osteogenezu, kardiogenezu, nefrogenezu, neurogenezu te eritrocitopoezu. Nakon rođenja održavaju koštanu masu; BMP-2/4/6/7/9/12/13 potiču diferencijaciju mezenhimskih progenitorskih stanica u hondroblaste i osteoblaste, a BMP-3 potiče proliferaciju ovih stanica. Jasno je dokumentiran učinak BMP-ova na diferencijaciju i proliferaciju adipocita, fibroblasta, mioblasta i živčanih stanica. Ovim djelovanjima BMP-ovi su uključeni u održavanje homeostaze zdravih tkiva u odraslom periodu, ali i u regeneraciju oštećenih tkiva (96). Istraživanja provedena posljednjih desetak godina pokazuju da je disregulacija aktivnosti BMP-ova povezana s razvojem fibroze bubrega, jetre i srca, aterosklerozom i tumorigenezom (97, 98).

#### 1.4.1 SINTEZA I AKTIVNOST BMP-2 I BMP-7

BMP-ovi se sintetiziraju unutar stanice u endoplazmatskom retikulu kao veliki prekursori, neaktivni pre-polipeptidi (453aminokiseline), koji sadrže signalne peptide na aminoterminalnom dijelu, pro-peptidno područje u sredini i zrele polipeptide na karboksi-terminalnom dijelu. Nakon što pro-proteinska kinaza pocijepa protein prekursor BMP-a na karboksi-terminalnom dijelu, oslobađa se zreli polipeptid BMP; zreli BMP-2 sadrži 115 aminokiselina, a zreli BMP-7 sadrži 139 aminokiselina. Nakon otpuštanja iz stanice BMP-ovi stvaraju homodimere od dviju identičnih podjedinica s disulfidnom vezom kroz cisteinski čvor, ali mogu stvarati i heterodimere dva različita BMP-a; BMP-2/BMP-6, BMP-2/BMP-7 i BMP-4/BMP-7. Homo ili heterodimerizacijom BMP-ovi postaju biološki aktivne signalne molekule; izgledno je da heterodimeri imaju znatno veću aktivnost od homodimera. U *in vitro* istraživanjima heterodimeri BMP-2/BMP-7 snažniji su od njihovih homodimera u testovima osteogene diferencijacije. Jednom otpušteni u koštani matriks ili krv, BMP-2 i BMP-7 mogu se inaktivirati serumskim proteazama (99 – 101).

Aktivacija signalnog puta BMP započinje vezanjem BMP-ova za heteromerne komplekse staničnih receptora tipa I i II. Ovi su receptori transmembranski polipeptidi s unutarstaničnom (citoplazmatskom) komponentom koja ima serin-treoninsku kinaznu aktivnost.

BMP-2 i BMP-7 mogu se vezati za heteromerne komplekse tri receptora tipa I; ALK2, ALK3 (BMPRIa), ALK6 i tri receptora tipa II; BMP receptor tipa II (BMPRII), aktivin receptor tipa IIa (ActRIIa) i aktivin receptor tipa IIb (ActRIIb). BMP-2 se većim afinitetom veže na receptore tipa I, osobito ALK3, odnosno na prethodno stvorene komplekse BMPRII-ALK3 ili ALK6, a BMP-7 višim se afinitetom veže za receptore tipa II. Nakon vezanja BMP-a, konstitutivno aktivna kinaza receptora tipa II fosforilira i zatim aktivira receptor tipa I. (100, 101).

Aktivirani receptori tipa I prenose signal citoplazmom fosforilacijom specifičnih receptorom reguliranih molekula SMAD. Na temelju funkcionalnih značajki molekule SMAD mogu se podijeliti u tri skupine: regulacijske molekule R-SMAD 1, 2, 3, 5, 8 i 9, zajednička molekula Co-SMAD 4 te inhibicijske molekule I-SMAD 6 i 7 (R-Smad). BMP-2 i BMP-7 vežu se na heteromere receptor tipa II i receptor tipa I – ALK2, 3 ili 6 čija fosforilacija aktivira molekule R-SMAD 1/5/8 koje se u citoplazmi vežu s molekulom Co-SMAD 4. Kompleksi R-SMAD 1/5/8 sa Co-SMAD 4 potom se premještaju u jezgru, gdje aktiviraju ili potiskuju izražaj gena u kombinaciji s drugim transkripcijskim čimbenicima i transkripcijskim koaktivatorima ili korepresorima. U osteoblastima ovakva signalizacija SMAD aktivira izražaj osteogenih gena transkripcijskog čimbenika 2 povezanog s RUNX2 (engl. *runt-related transcription factor 2*) i osterixom važnih regulatora osteogeneze. Inhibicijske molekule I-SMAD 6 i 7 izlaskom iz stanične jezgre u citoplazmu sprečavaju fosforilaciju molekula R-SMAD 1 i 5. BMP-2 i BMP-7 aktiviraju molekule R-SMAD 1,5 i 8, a BMP-7 može aktivirati i molekulu I-SMAD 6. Aktivacija molekula R-SMAD 2 i 3 povezana je s drugim ligandima (nad)obitelji TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ , aktivin, GDF) nakon aktivacije receptorima tipa I ALK4, ALK5 i ALK7 (100 – 103). Osim kanonskom signalizacijom SMAD, BMP-ovi znatno rjeđe svoja djelovanja mogu ostvariti SMAD-neovisnim putovima. SMAD-neovisna signalizacija posredovana je mnogobrojnim staničnim kinazama; izvanstaničnim signalom regulirane kinaze ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*), mitogen aktivirane kinaze p38, MAPK p38 (engl. *mitogen-activated protein kinases*), C-jun N-terminalne kinaze, JNK (engl. *c-Jun-N terminal Kinase*), fosfatidil inozitol 3 kinaze, PI3K (engl. *phosphatidyl inositol 3 Kinase*), protein kinaza C i D-PK C, D (engl. *protein kinase*), TGF- $\beta$  aktivirajuće kinaze 1, TAK1 (engl. *TGF- $\beta$  activated kinase*). Dok je glavni mehanizam koji vodi do kanonske SMAD-

ovisne signalizacije BMP dobro istražen i poznat, vrlo malo se zna o redoslijedu molekularnih događaja koji rezultiraju nekanonskom signalizacijom BMP. Ipak, poznato je da SMAD neovisnim signalnim putovima BMP-ovi djeluju na migraciju, diferencijaciju, proliferaciju, ali i apoptozu stanica. Dokumentirana su djelovanja BMP-ova SMAD-ovisnim i SMAD-neovisnim signalnim putovima, ovisno o dozi; niske doze BMP-7 dovode do povećane proliferacije stanica reguliranih SMAD-neovisnim signalnim putem MAPK p38, a visoke doze BMP-7 suzbijaju proliferaciju stanica, a kontrolira ih signalni put SMAD (101, 104). Postoji nekoliko regulacijskih povratnih mehanizama koji pomažu u kontroli aktivnosti BMP-ova, a mogu biti unutarstanični i izvanstanični. Antagonisti BMP-ova inhibiraju signalizaciju BMP izravnim vezanjem za BMP i/ili blokiranjem kritičnih epitopa na receptorima. Djelovanje antagonista ovisi o njihovom izražaju, biološkoj raspoloživosti i afinitetu. Noggin, sklerostin, gremlin i follistatin izravno se vežu za BMP-2 i BMP-7 u izvanstaničnom matriksu, ali mogu se vezati i za BMP-receptore. Kordin inhibira vezanje BMP-7 na receptor, a proteini izvanstaničnog matriksa fibronektin, fibrinogen i tenascin C mogu se vezati na BMP-2 (100,105,106). Dullard fosfataza i ubikvitin ligaza mogu inhibirati unutarstaničnu signalizaciju BMP-ova. Inhibicijske molekule SMAD I-SMAD 6 i 7 izravno reguliraju signalizaciju SMAD izazvanu BMP-2 (100, 101).

#### 1.4.2. BMP-2 I BMP-7 U EMBRIONALNOM RAZVOJU

U životinjskim modelima BMP-2 i BMP-7 izraženi su u endometriju i placenti te su neophodni za embrionalnu implantaciju i embrionalnu organogenezu (107, 108). Nedvojbeno je dokazano da su BMP-ovi uključeni u složene razvojne procese tijekom embriogeneze; utječu na diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu stanica iz svih triju zametnih listića. Delecija BMP-2 smrtonosna je za embrij, a delecija BMP-7 dovodi do smrti odmah nakon rođenja.

Embriji s nedostatkom BMP-2 umiru između sedmog i desetog dana trudnoće zbog manjkavog stvaranja amniona/koriona i stvaranja srca u egzocelomičkoj šupljini umjesto u amnionskoj šupljini (109).

BMP-2 je ključan u gotovo svakom stupnju neuralnog razvoja, osobito kod zatvaranja neuralne cijevi. Sudjeluje u remodeliranju bjeloočnice i stvaranju retinalnog sustava. Međutim, prekomjerni izražaj BMP-2 može dovesti do rane kratkovidnosti, stoga njegova aktivnost mora biti strogo regulirana tijekom embriogeneze. BMP-2 pomaže u programiranoj staničnoj smrti za pokretanje apoptoze u distalnim udovima, omogućujući stvaranje prstiju.

BMP-2 intenzivno sudjeluje u kardiogenezi (110), a potiče i angiogenetski učinak u endotelnim stanicama (111). BMP-2 sudjeluje u razvoju plućnog parenhima; potiče stvaranje alveolarnih stanica i regulira remodeliranje pluća. Na kraju, BMP-2 je potreban za pravilnu osteogenezu, hondrogenezu i adipogenezu tijekom razvoja (100).

BMP-7 ima važnu ulogu u embriogenezi bubrega; neophodan je za razvoj glomerula, tubula, ali i uretera, utječe na konačan broj nefrona i veličinu organa. Nedostatak BMP-7 uzrokuje prerani prekid nefrogeneze zbog povećane apoptoze mezenhimskih stanica iz kojih se razvijaju glomeruli i tubuli (112, 113). Homozigotni miševi s *null* mutacijom za BMP-7 umiru u slici uremije nakon okota (114).

#### 1.4.3. BMP-2, BMP-7 I HOMEOSTAZA TKIVA I ORGANA

BMP-ovi su izraženi u mnogim stanicama i tkivima odraslog organizma. Potiču diferencijaciju mezenhimskih stanica u fenotipski različite stanice, ovisno o trenutnim potrebama tkiva u kojima su izraženi. Sudjeluju u proliferaciji endotelних stanica i VSMC-a, kardiomiocita, enterocita, epitelnih tubularnih stanica.

Istraživanja su pokazala da disregulacija signalizacije BMP uzrokuje patofiziološke promjene u mnogobrojnim tkivima i organima, a dovodi i do tumorigeneze raznih organa (dojka, pluća, jetra, bubreg) (97, 100, 101). Najbolje je dokumentirana aktivnost BMP-2 i BMP-7 u koštanom sustavu.

Koštano tkivo kompozit je organske matrice (koja je većinski sastavljena od kolagena) i anorganske mineralne strukture izgrađene od kalcijeva fosfata-hidroksiapatita:  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . U koštanom tkivu prisutne su i mezenhimske i hematopoetske matične stanice koje imaju sposobnost pretvorbe u koštane stanice osteoklaste i osteoblaste koji resorbiraju staru ili oštećenu kost i izgrađuju novu; koštano je tkivo metabolički aktivno i stalno se pregrađuje.

Hematopoetske matične stanice diferenciraju se u osteoklaste potaknute čimbenicima kao što su aktivatori receptora liganda nuklearnog čimbenika kapa-B RANKL (engl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*)- i čimbenik stimulacije kolonija makrofaga – M-CSF (engl. *macrophage colony-stimulating factor*).

Osteoklasti resorbiraju koštani matriks (koji uz kolagen sadrži i proteine osteokalcin, osteonektin) oslobađajući BMP-2 i kalcij. Mezenhimske matične stanice mogu se diferencirati u osteoblaste, hondrocite i adipocite. Ova diferencijacija rezultat je aktivnosti više BMP-ova:

BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9, BMP-12 i BMP-13, ali je izraženost i aktivnost BMP-2 najintenzivnija. Osteoblasti stvaraju novu kost na dva načina: razlikujemo intramembransku i enhondralnu osifikaciju. Tijekom intramembranske osifikacije osteoblasti stvaraju i izlučuju kolagen tipa I i kalcijev hidroksiapatit koji se veže na proteine izvanstaničnog matriksa, što dovodi do mineralizacije. Enhondralnu osifikaciju započinju hondrociti koji hipertrofiraju, izgrađuju hrskavicu u koju prodiru krvne žile i osteoblasti. BMP-ovima posredovana diferencijacija mezenhimskih matičnih stanica u adipocite također je važna za rast i remodeliranje kostiju, ali previše masnih stanica unutar kosti smanjuje čvrstoću kosti i povećava rizik od prijeloma. Faze pregradnje kosti u procesu cijeljenja prijeloma kod odraslog čovjeka uvelike nalikuju slijedu embrionalnog razvoja kosti. Novostvoreni hrskavični prijelomni kalus postupno vaskularizira, a potom okošta u prosječnom vremenu od dvadesetak tjedana od prijeloma (100).

Aдекватna ravnoteža resorpcije kosti osteoklastima, poticanja unutarembranske i endohondralne osifikacije, aktivacija adipogenih signalnih putova nužna je za održavanje homeostaze koštanog sustava. Abnormalni gubitak kosti i hrskavice javlja se kod osteoporoze i osteoartritisa. Istraživanja upućuju na to da je jedan od mehanizama nastanka ovih patofizioloških stanja nepravilna funkcija receptora ALK3 (BMPRIa) na osteoblastima (100).

BMP-2 djeluje na progenitorske endotelne stanice i potiče angiogenezu u ishemijom ozlijeđenim tkivima, ali i u tumorskim tkivima (111, 115).

Izraženost BMP-2 u hepatocitima zdrave jetre smanjuje proliferaciju hepatocita. Suprotno, kod parcijalne hepatektomije s posljedično manjom izraženosti BMP-2 dolazi do povećane proliferacije hepatocita i povećanja volumena organa (116).

BMP-7 izražen je u bubrezima duž čitavog nefrona; na epitelnim stanicama distalnog tubula i sabirnih cijevi, ali i adventiciji renalnih arterija. Dokumentirana je aktivnost BMP-7 u podocitima glomerularnih kapilara, mezangijskim stanicama i fibroblastima. Kod zdravog bubrega ne registrira se aktivnost BMP-7, iako je njegova izraženost visoka, a kod ozljede bubrega razina je aktivnosti BMP-7 visoka, što se može pripisati regulacijskom mehanizmu koji se temelji na povišenoj razini receptora BMP tijekom ozljede (117). Oštećeni bubreg nakon ishemije i reperfuzije ima kapacitet potpuno vratiti svoju strukturu i funkciju. Vrlo brzo nakon reperfuzije izražaj BMP-7 znatno se smanjuje, posebno u vanjskom dijelu srži i glomerulima, što bi mogla biti posljedica povećanog izražaja TGF- $\beta$ 1. S druge strane,

povećava se razina BMP-7 u epitelnim stanicama proksimalnih tubula. BMP-7 potiče migraciju, diferencijaciju i proliferaciju tubularnih epitelnih stanica. Eksperimentalni životinjski modeli pokazuju da BMP-7 sprječava ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje; primjena BMP-7 smanjuje područja nekroze i infarkta bubrega, smanjen je i opseg apoptoze; ovaj terapijski potencijal BMP-7 rezultat je aktivacije mehanizama regeneracije sličnih onima koji su prisutni u embrionalnom razvoju bubrega (118). U životinjskom modelu hladne ishemije transplantiranog bubrega zabilježeno je bolje očuvanje tubularnog epitela dodatkom BMP-7 (119). Oštećenje tubularnih epitelnih stanica (ujedno i najbrojnijih) najodgovornije je za progresiju KBB-a. Tubularne epitelne stanice glavni su bubrežni izvor kemokina, citokina i faktora rasta koji pridonose zamjeni epitelnog tkiva za mezenhimalno. To dovodi do nakupljanja i aktivacije fibroblasta u intersticiju i razvoja fibroze bubrežnog parenhima, što je karakteristika KBB-a. BMP-7 inhibira sekreciju proupalnih kemokina od strane tubularnih epitelnih stanica, sprečava epitelno-mezenhimsku tranziciju i vraća integritet tubularnim epitelnim stanicama (120). Endogena primjena BMP-7 ublažila je progresiju fibroze bubrega u dva genetska modela KBB-miša, Alportovu sindromu i lupusnom nefritisu (114).

BMP-7 antagonizira fibrozu i u drugim organima: srcu, plućima i jetri (121 – 123). BMP-7 ima antagonistički učinak na signalizaciju inzulina, povećava unos glukoze u tkivima osjetljivim na inzulin poput masnog tkiva i mišića i utječe pozitivno na homeostazu glukoze (124).

#### 1.4.4. BMP-2, BMP-7 I VASKULARNI KALCIFIKATI

Nastanak vaskularnih kalcifikacija složeni je patološki proces koji se odvija u intimi i mediji arterijske stijenke; ovaj patološki proces u stijenci krvne žile vrlo je sličan fiziološkom procesu izgradnje kosti. Oba procesa uključuju aktivaciju BMP-ova. U nastanku vaskularnih kalcifikata BMP-aktivnost odvija se različitim tipovima stanica: endotelnim, VSMC, fibroblastima, pericitima (stanicama koje izgrađuju intimu, mediju i adventiciju arterija) i cirkulirajućim progenitorskim mezenhimskim stanicama iz krvnog optoka (125).

##### Vaskularni kalcifikati u intimi arterija

Endotel koji oblaže čitav krvožilni sustav heterogena je epitelna struktura visoke biološke i metaboličke aktivnosti. U endotelu se sintetiziraju čimbenici rasta i agregacijsko-

koagulacijskog puta, receptori za lipoproteine i inzulin. Održavaju se aktivnosti enzima lipoproteinske lipaze i angiotenzin-konvertaze, metaboliziraju noradrenalin i serotonin te stvaraju produkti arahidonske kiseline. Endotelne vaskularne stanice prepoznaju i prilagođavaju se na različite humoralne, mehaničke i hemodinamske promjene. Svojim endokrinim, autokrinim i parakrinim djelovanjima endotel utječe na VSMC u mediji arterijske stijenke, ali i na trombocite i leukocite u krvnom optoku. Endotelna disfunkcija (ED) nastaje zbog „ozljede“ endotela i posljedičnih proupalnih, protrombotskih i vazokonstriksijskih aktivnosti u (najčešće neuspješnim) pokušajima popravka oštećenja izazvanih „ozljedom“.

Patofiziološki čimbenici koji dovode do nastanka ED-a slobodni su radikali kisika i/ili oksidativni stres, hiperglikemija, hiperhomocisteinemija, HLP; ovi čimbenici patognomonični su za nereguliranu arterijsku hipertenziju, srčane bolesti, KBB, šećernu bolest, autoimune bolesti, metaboličku bolest u pretilosti (126). Patofiziološke su posljedice ED-a višestruke, ne samo privremene nego i trajne. Nedostatna sinteza i sekrecija vazodilatatora dušikova oksida – NO i prostaciklina, a povećana sinteza vazokonstriktora endotelina 1 i tromboksana oslabljuje vazodilataciju, potiče vazokonstrikciju i agregaciju trombocita. ED karakterizira povećan endotelni izražaj proupalnih (NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), kemotaktičkih (MCP-1), adhezijskih molekula (vaskularna adhezijska molekula 1 – VCAM-1, engl. *vascular cell adhesion molecule-1*, unutarstanična adhezijska molekula 1 – ICAM-1 engl. *intercellular adhesion molecule-1*) i BMP-2, zbog čega dolazi do nakupljanja monocita, limfocita, cirkulirajućih progenitorskih mezenhimijskih stanica, lipoproteina kroz povećano propustan endotel u subendotelni prostor. Oksidirani lipoproteini potiču stvaranje adhezijskih molekula i upalnih citokina, a mogu postati i antigeni, započinjući time imunološki odgovor posredovan limfocitima T. Monociti transformirani u makrofage pokušavaju ograničiti upalu fagocitozom oksidiranih lipoproteina. Makrofagi prekrani fagocitiranim lipoproteinima transformiraju se u pjenušave stanice čime nastaje tipična rana aterosklerotska lezija – masna pruga. Ako upalno zbivanje ustraje, makrofagi u pokušaju ograničenja upale trajno otpuštaju proupalne citokine koji potiču migraciju i proliferaciju VSMC-a iz medije i fibroblasta iz adventicije. Rezultat je nastanak aterosklerotskog plaka koji sadržava lipide (unutarstanični i izvanstanični kolesterol i fosfolipide), upalne stanice (makrofage, limfocite T), VSMC, vezivno tkivo (kolagen, glikozaminoglikani, elastična vlakna) i trombocite. BMP-2 potiče transformaciju VSMC-a i cirkulirajućih progenitorskih mezenhimijskih stanica u osteo/hondroblastni fenotip pa proces sličan stvaranju kosti uzrokuje kalcifikaciju unutar plaka (127).



### Vaskularni kalcifikati u mediji arterija

U fiziološkim uvjetima VSMC pomoću kontraktilnog proteina aktina  $\alpha$ , endogenih i cirkulirajućih inhibitora kalcifikacije, kao što su matriksni protein GLA, anorganski pirofosfat, fetuin A, sklerostin, osteoprotegerin (OPG) i BMP-7 održavaju normalnu kontraktilnost krvne žile i optimalni protok krvi (128). Fiziološka razina kalcija u krvi važna je za regulaciju kontrakcije i funkcije VSMC-a. ED potiče mijenjanje fenotipa VSMC-a iz kontraktilnog u sintetski; infiltracija aterosklerotskog plaka makrofagima najvažniji je događaj u nastanku vaskularnih kalcifikata u mediji. Makrofagi otpuštaju proupalne citokine TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  koji mogu potaknuti endotelno-mezenhimski prijelaz posredovan BMP-2 i BMP-4 (115). VSMC se diferenciraju u osteoblastične VSMC, povećava se sinteza i izlučivanje promotora kalcifikacije BMP-2, osteokalcina i osteopontina. Osteoblastične VSMC otpuštaju kalcificirajuće izvanstanične vezikule u intimu i/ili mediju krvne žile. Vezikule su važan generator kalcifikacije jer osiguravaju kalcijev hidroksiapatit i njegovo taloženje u izvanstaničnom prostoru (129).

Dobro je dokumentirana uloga BMP-2 kao promotora nastanka vaskularnih kalcifikata. Oštećene endotelne stanice i osteoblastični VSMC-i znatan su izvor BMP-2 (130 – 132). Razina BMP-2 povećana je u stijenci aorte, ali i u serumu u životinjskom modelu KBB-a (133). Istraživanje u bolesnika sa šećernom bolesti i koronarnom bolesti pokazalo je povezanost veće varijabilnosti razine glukoze u krvi i vaskularnih kalcifikata, a ekstenzijom na životinjski model i veću izraženost BMP-2 u kalcifikatima (134). Kronična bubrežna bolest, šećerna bolest i periferna arterijska aterosklerotska bolest povezane su s većom izraženošću BMP-2 u mediji krvnih žila, za razliku od periferne arterijske aterosklerotske bolesti bez KBB-a i šećerne bolesti (135). U aterosklerotski promijenjenim trikuspidalnim srčanim zaliscima s kalcifikatima zabilježena je povećana izraženost kalcij osjetljivih receptora i BMP-2, za razliku od zalistaka bez kalcifikata (136). Suprotno BMP-2, BMP-7 održava kontraktilni fenotip VSMC-a; putem molekula antiSMAD6 inhibira diferencijaciju VSMC-a u osteogenetske stanice (137). U životinjskom modelu KBB-a egzogena primjena BMP-7 smanjila je razvoj vaskularnih kalcifikata, ali nije dovela do regresije već nastalih kalcifikata (138). BMP-7 ima učinak na vrlo važan početni patofiziološki mehanizam u nastanku vaskularnih kalcifikata, a to je diferencijacija kemotaksijom pristiglih monocita u „ozlijeđenu“ stijenku krvne žile. Monociti pristigli u vaskularnu stijenku diferenciraju se u dvije vrste makrofaga. Makrofagi M1 ili klasično aktivirani makrofagi promiču i osnažuju upalni odgovor izlučujući MCP-1, TNF- $\alpha$  i IL-6. Makrofagi M1 mogu aktivirati BMP-2 i

BMP-4 čime započinje osteogenetska kaskada. Nasuprot tome, makrofagi M2 ili alternativno aktivirani makrofagi djeluju protuupalno i izlučuju antagonist receptora IL-1, IL-10 i arginaze. M2 makrofagi ograničavaju upalu, sudjeluju u popravku tkiva i zacjeljivanju rana. BMP-7 inhibira diferencijaciju u proupalne makrofage M1 i potiče diferencijaciju u protuupalne makrofage M2. Protektivno djelovanje BMP-7 karakteristično je za ranu fazu ateroskleroze, no nakon iscrpljivanja ovog patofiziološkog mehanizma aterogeneze posredovanog makrofagima, BMP-7 ne usporava znatno napredovanje ateroskleroze i nastanak vaskularnih kalcifikata (101, 139). Istraživanja na životinjskim modelima pokazala su smanjene cirkulacijske razine BMP-7 kako je ateroskleroza napredovala, dok je egzogeno primijenjen BMP-7 znatno oslabio progresiju bolesti. Ovi podatci upućuju da BMP-7 ima protektivnu i palijativnu ulogu u aterosklerotskoj kalcificirajućoj vaskularnoj bolesti (101). U vaskularnim kalcifikatima medije renalnih arterija bolesnika s KBB-om nađena je znatna izraženost osteoinduktivnog BMP-2, ali i osteoinhibitornog BMP-7, što upućuje na još nerasvijetljene mehanizma djelovanja ovih BMP-ova (140).

Vaskularni kalcifikati intime arterija (ateroskleroza) posljedica su enhondralne osifikacije te se često u aterosklerotskim lezijama nalaze hondrociti i hrskavica. Aterosklerotski plakovi sužuju lumen arterija i dovode do smanjene prokrvljenosti i oksigenacije organa; u slučaju rupture plaka može nastati akutna okluzija arterije koja uzrokuje ishemiju, a potom i nekrozu irigacijskih tkiva i organa (srca, bubrega, mozga).

Kalcifikacija medije arterije (arterioskleroza, Monckebergova kalcifikacija) rezultat je unutarmembranske osifikacije. Uzrokuje povećanu krutost arterijske stijenke i posljedično povišen arterijski tlak što rezultira daljnjom vaskularnom ozljedom. Patognomonični su za bolesnike s KBB-om, osobito one koji nadomještaju bubrežnu funkciju dijalizom i pozitivno koreliraju s duljinom dijaliznog liječenja. Povišene plazmatske razine fosfora i kalcija, PTH, fibroblastnog faktora rasta 23, osteopontina, osteokalcina i BMP-2 karakteristične su za KBB i povezane su s nastankom i opsežnošću vaskularnih kalcifikata (141).

## 2. CILJ RADA I HIPOTEZA

Cilj je ovog istraživanja procijeniti izraženost BMP-2 i BMP-7 u arterijskoj stijenci primatelja bubrega i njezinu povezanost s neželjenim ranim posttransplantacijskim ishodom DGF-a.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je ozljeda i posljedična disfunkcija endotelnih stanica s razvojem vaskularnih kalcifikata u miljeu kronične upale u uremiji često zastupljena u primatelja bubrega. Izraženost BMP-2 u endotelu i VSMC arterija povezana je s osteinduktivnim djelovanjem i nastankom vaskularnih kalcifikacija, a BMP-7 inhibira nastanak vaskularnih kalcifikacija. Vaskularna patologija primatelja bubrega jedan je od mnogobrojnih čimbenika koji mogu pridonijeti nastanku DGF-a. Unatoč suprotnim aktivnostima u aterosklerotskoj kalcificirajućoj vaskularnoj patologiji, oba BMP-a sprječavaju ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje koje je neizbježno u transplantacijskom liječenju, a o čijem intenzitetu i trajanju ovisi rana funkcija transplantata.

Pretraživanjem literature dosad objavljenih rezultata izraženosti BMP-ova u vaskularnim stanicama, *in vitro*, *in vivo* istraživanjima na životinjama i humanim istraživanjima nismo pronašli rezultate istovremenog izražaja BMP-2 i BMP-7 u vaskulaturi primatelja bubrega i ranog transplantacijskog ishoda.

Uvažavajući rezultate dosadašnjih istraživanja, mišljenja smo da je analiza krvnih žila primatelja zanimljiva mogućnost za procjenu posttransplantacijskog ishoda. Rezultati ovog istraživanja pokazat će može li izraženost BMP-2 i BMP-7 u arterijskoj stijenci primatelja biti prediktor DGF-a te može li ih se u budućnosti primjenjivati kao dijagnostičke i prognostičke čimbenike.

Primarni cilj:

- Da li je i kako DGF povezan s izraženošću BMP-2 i BMP-7 (imunohistokemijsko bojenje) u endotelu i VSMC epigastrične arterije primatelja?

Sekundarni ciljevi:

- Da li su i kako radiološki potvrđeni makrokalcifikati krvnih žila zdjelice te mikrokalcifikati potvrđeni Von Kossa bojenjem povezani s izraženošću BMP-2 i BMP-7 u endotelu i VMSC epigastrične arterije primatelja?

- Da li su i kako osnovna bubrežna bolest, duljina liječenja dijalizom, pušenje, BMI HLP, kardiovaskularni i cerebrovaskularni događaji u anamnezi primatelja bubrega povezani s izraženošću BMP-2 i BMP-7 u endotelu i VSMC epigastrične arterije?

S obzirom na dosadašnja saznanja, očekujemo da će DGF biti učestaliji u primatelja s većom izraženošću BMP-2 i manjom izraženošću BMP-7 u endotelu i VSMC-u arterijske stijenke. Primatelji bubrega s radiološki potvrđenim makrokalcfikatima krvnih žila zdjelice imat će veću izraženost BMP-2 u endotelu i VSMC epigastrične arterije te manju izraženost BMP-7.

### 3. ISPITANICI I POSTUPCI

#### 3.1. ISPITANICI

U nerandomizirano prospektivno istraživanje s kontrolnom skupinom uključeni su (sljedbeni) ispitanici (stariji od 18 godina) koji su liječeni transplantacijom bubrega u Kliničkom bolničkom centru Zagreb od siječnja 2012. do ožujka 2013. godine. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo ustanove i provedeno je prema Helsinškoj deklaraciji Svjetske zdravstvene organizacije o etičkim principima u medicinskim istraživanjima te Istanbulske deklaraciji Svjetske zdravstvene organizacije o kupoprodaji organa i transplantacijskom turizmu iz 2008. godine. Informirani potpisani pristanak ispitanika bio je uvjet za uključenje u istraživanje.

Iz istraživanja su isključeni ispitanici koji su nakon transplantacijskog postupka dulje od 24 sata liječeni u Jedinici intenzivnog liječenja te ispitanici u kojih je DGF uzrokovan akutnim odbacivanjem bubrega, infekcijom, urološkim komplikacijama (krvarenje, opstrukcija kanalnog sustava bubrega, uretera) te akutnim vaskularnim događajima: embolijom renalne arterije i/ili trombozom renalne vene transplantata. Uzorkovanu populaciju čini 79 ispitanika.

Protokol neposredne predtransplantacijske obrade (usuglašen s Hrvatskim društvom za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju i Ministarstvom zdravstva Republike Hrvatske) uključuje uzimanje detaljne anamneze, fizikalni pregled uz laboratorijsku i radiološku dijagnostiku neophodnu za operativni zahvat uz konzilijarno (internist nefrolog, urolog, anesteziolog) razmatranje dobivenih nalaza i donošenje odluke o sposobnosti ispitanika za transplantacijsko liječenje.

Prikupljeni su podaci o dobi, spolu, dijagnozi osnovne bubrežne bolesti, duljini liječenja dijalizom, pušenju, BMI-ju, arterijskoj hipertenziji, šećernoj bolesti, HLP-u, ranijim kardiovaskularnim i cerebrovaskularnim bolestima. Anteroposteriorna radiološka snimka donjeg abdomena i zdjelice učinjena je na dijagnostičkom klasičnom analognom uređaju za konvencionalnu radiologiju jačine rendgenske cijevi 120 kilovata –kW (Siemens Healthcare, Erlangen, Njemačka) na dvoslojnom rendgenskom filmu dimenzija 35 x 43 cm, razvijena je u tamnoj komori uz korištenje razvijaača i fiksira prema uputama proizvođača. Transplantacijski urolog procijenio je prisutnost vaskularnih kalcifikata; kategorizirani su kao prisutni ili odsutni.

Kontrolnu skupinu sačinjava 16 ispitanika bez anamneze šećerne bolesti koji su nefrektomirani u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Zagreb od ožujka 2012. godine do ožujka 2013. godine zbog lokaliziranog karcinoma bubrega (T1, N0, M0) uredne bubrežne funkcije (procijenjena razinom kreatinina u serumu i formulom GFR CKD-EPI).

Podatci o darivateljima bubrega prikupljeni su uvidom u medicinsku dokumentaciju Eurotransplanta (elektronički, uz zaštićen šifrirani pristup): dob, spol, uzrok smrti, pušenje, BMI, šećerna bolest, arterijska hipertenzija, kardiovaskularni i cerebrovaskularni događaji u anamnezi, srčana reanimacija tijekom intenzivne skrbi, predeksplantacijska razina serumskog kreatinina. Darivatelji po proširenim kriterijima („marginalni“ darivatelji) definirani su sljedećim karakteristikama: darivatelj stariji od 60 godina ili darivateljska dob između 50 i 60 godina uz dva dodatna kriterija: smrt uzrokovana cerebrovaskularnom bolešću, kreatinin u serumu kod prijama veći od 137  $\mu\text{mol/L}$ , arterijska hipertenzija (41).

Za svaki transplantacijski postupak zabilježeno je vrijeme hladne ishemije.

Svi ispitanici primili su indukcijsku imunosupresijsku terapiju monoklonskim protutijelom koje blokira receptor za IL-2 na aktiviranim limfocitima T – baziliksimumab. Imunosupresijskaterapija održavanja sastojala se od tri lijeka: kortikosteroidi – metilprednizolon, MMF i inhibitor kalcineurina; takrolimus (77 ispitanika) ili ciklosporin (2 ispitanika).

## 3.2. POSTUPCI

### 3.2.1. IMUNOGENETIČKI TESTOVI

Imunogenetički testovi napravljeni su u predtransplantacijskoj pripremi prema Programu Eurotransplanta (Republika Hrvatska punopravna je članica od 2007. godine) u Zavodu za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb koji ima akreditaciju Europske federacije za imunogenetiku (od 2007. godine).

Tipizacija leukocitnih antigena lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-DR ispitanika i darivatelja učinjena je metodom PCR. Podudaranje za antigene HLA ispitanika i darivatelja bubrega izraženo je kao broj nepodudarnosti (MM) 0 – 6.

U serumu ispitanika određena je vrsta i broj HLA protutijela testom PRA.

Test križne reakcije (CM) za otkrivanje protutijela HLA ispitanika na antigene HLA darivatelja (DSA) proveden je metodom CDC. Uvjet za transplantacijsko liječenje bio je negativan rezultat ovog testa.

Izrada imunogenetičkih testova provedena je na navedenim uređajima uz korištenje navedenih reagensa.

#### Uređaji:

MagNA Pure Compact

Nano Drop™ Lite

Gene Amp PCR System 9700

Električna jedinica za elektroforezu Cleaver MP-500

Kadica za horizontalnu elektroforezu Cleaver

Macrovue 2011 Transilluminator

NuGenius gel kamera

Svjetlosni mikroskop OLYMPUS IX 51.

#### Reagensi:

MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Roche

Olerup SSP Lowresolution Typing Kits (HLA-A, B, C, DR, DQB)

LIFECODES HLA – SSO Typing Kits (HLA-A, B, C, DR, DQB)

LIFECODES LifeScreen Deluxe Kit

LIFECODES LSA Class I Kit

LIFECODES LSA Class II Kit

Zamrznuti panel HLA tipiziranih limfocita.

### 3.2.2. PRIKUPLJANJE UZORAKA EPIGASTRIČNE ARTERIJE

Kirurški postupci transplantacije bubrega učinjeni su na Klinici za urologiju KBC-a Zagreb. Svaki kirurški postupak započinjao je incizijom kože po Gibsonu za pristup ilijakalnoj regiji i ilijačnim krvnim žilama. Jedan od kirurških postupaka tijekom transplantacije jest prepariranje unutarnje i vanjske ilijačne arterije uz obvezno podvezivanje donje epigastrične arterije koja je ogranak vanjske iliačne arterije. Nakon podvezivanja u svrhu našeg istraživanja učinjena je resekcija epigastrične arterije u duljini od 1 cm, a uzorak je u sterilnoj posudi s formalinom upućen u Kliniku za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb.

### 3.2.3. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJENJE ZA BMP-2 I BMP-7

Provedeno je na Klinici za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Preuzeti uzorci epigastrične arterije (za kontrolnu skupinu renalne arterije) obojeni su hematoksilinom i eozinom. Fiksirani su u 10 % puferiranom formalinu i uklopljeni u parafinski blok. Parafinski rezovi debljine 4 mikrometra deparafinirani su u ksilolu i rehidrirani u silaznom nizu alkohola. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je s 0,3 % vodikovim peroksidom tijekom 10 minuta. PT link spremnici (Dako, Glostrup, Danska) korišteni su za uklanjanje parafina i vraćanje epitopa izazvano toplinom (EnVision FLEX + K 8000, 3 in 1, otopina pH 9,0; Dako). Sva stakalca su inkubirana 20 minuta na 97°C i ostavljena u puferu za pranje (EnVision FLEX Wash Buffer pH 7,6.; Dako). Bojanje je provedeno korištenjem automatiziranog imunobojava (Autostainer Link 48; Dako). Uzorci su inkubirani tijekom 10 minuta u endogenom bloku (EnVision FLEX + K8000; Dako), a potom s primarnim monoklonskim protutijelom Pro-BMP-2 (MAB 3551 R&D systems, Minneapolis, Minnesota) na sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta, razrijeđeni 1:1000, a isti je postupak ponovljen s Pro-BMP-7 (MAB 3541 R&D systems, Minneapolis, Minnesota) monoklonskim protutijelom. Bojanje je vizualizirano nakon inkubacije s kromogen 3,3'-diaminobenzidina (Chromogen- K 8000, Dako) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stakalca su potom kontrastno obojena hematoksilinom 10 minuta. Pozitivna imunoreaktivnosti vidljiva je smeđe obojenom citoplazmom u endotelnim i VSMC.

### 3.2.4. VON KOSSA BOJENJE ZA MIKROKALCIFIKATE

Provedeno je na Klinici za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Preuzeti uzorci epigastrične arterije fiksirani su u formalinu i ugrađeni u parafin. Kratko nakon fiksacije tkivo je izloženo 60 minuta sunčevu svjetlu u 5 %-tnoj otopini AgNO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Nakon ispiranja u destiliranoj vodi tkivo je izloženo 2 minute 5 %-tnom Na-tiosulfatu. Nakon ispiranja u destiliranoj vodi tkivo je bojeno u otopini *nuclear fast red* 5 minuta. Ponovno je ispirano u destiliranoj vodi te dehidrirano u 96 %-tnom alkoholu, apsolutnom alkoholu uz bistrenje u ksilolu 2 puta. Za potvrdu pozitivnog ili negativnog von Kossa bojenja bez obzira na resecirani dio arterije, učinjeni su rezovi sa oba kraja arterijskog uzorka.



### 3.2.5. MIKROSKOPIRANJE

Provedeno je na Klinici za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb. Preparati obojeni imunohistokemijskom metodom, kao i obojeni Von Kossom analizirani su na fluorescentom mikroskopu (Leica DMLB Microsystems, Wetzlar, Njemačka) te su učinjene mikrofotografije digitalnom kamerom (Olympus SC 100, Tokyo, Japan).

Sve preparate mikroskopirala su dva mikroskopičara (slijepo).

Izraženost BMP-2 i BMP-7 procijenjena je semikvantitativnom metodom. Analizirano je 500 stanica svakog uzorka u osam polja pri povećanju 400 puta. Stanice smeđe obojene citoplazme smatrane su pozitivnim, a preparati su bodovani prema raspodjeli pozitivnih stanica; 3 boda više od 75 % pozitivnih stanica; 2 boda 50 – 74 % pozitivnih stanica; 1 bod 10 – 49 % pozitivnih stanica; 0 manje od 10 % pozitivnih stanica.

**Tablica 2.** Semikvantifikacija intenziteta izraženosti BMP-ova u citoplazmi stanica

<b>% pozitivnih stanica</b>	<b>bodovi</b>	<b>Stupanj izraženosti</b>
< 10%	0	Nema izraženosti
10-49%	1(+)	Stupanj 1
50-74%	2(++)	Stupanj 2
>75%	3(+++)	Stupanj 3

Analiziran je jedan prerez kroz uzorak epigastrične arterije obojen Von Kossa metodom pri povećanju 400 puta. Kalcifikati su obojeni crno. Rezultat je izražen kao pozitivan (prisutni kalcifikati) ili negativan (nisu prisutni kalcifikati).

### 3.2.6. PROCIJENA FUNKCIJE TRANSPLANTIRANOG BUBREGA

Funkcija transplantiranog bubrega procijenjena je svakodnevnim kliničkim pregledom ispitanika i laboratorijskim testovima učinjenim u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb, Referentni centar Ministarstva zdravstva za kliničku biokemiju i

molekularnu dijagnostiku (Akreditacija prema normi HRN EN ISO 15189:2012 od 2014. godine). Laboratorijski testovi za procjenu funkcije transplantiranog bubrega određivanje su vrijednosti ureje (mmol/L), kreatinina (umol/L), kalija (mmol/L) iz krvnog seruma, klirensa kreatinina (ml/min) iz 24-satnog urina (ml). Testovi su provedeni svakodnevno prvih osam dana nakon transplantacijskog postupka.

Ureja je određena automatiziranom fotometrijskom metodom s ureazom i glutamat-dehidrogenazom (GLDH). Djelovanjem ureaze ureja se hidrolizira, a nastali amonijak reagira uz katalitičko djelovanje GLDH s 2-oksoglutaratom i reduciranim oblikom koenzima nikotinamid-adenin-dinukleotida (NADH). Smanjenje apsorbancije do kojeg dolazi proporcionalno je koncentraciji dušika iz ureje u uzorku i mjeri se na 340 nm.

Mjerenje kreatinina provedeno je kontinuiranom fotometrijskom metodom s alkalnim pikratom. Princip metode temelji se na reakciji kreatinina u lužnatoj otopini s pikrinskom kiselinom stvarajući kompleks žuto-crvene boje. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji kreatinina u uzorku i mjeri se na 520 nm.

Kalij je određen metodom indirektna potenciometrije kojom se mjeri koncentracija slobodnih iona u uzorcima koji su prethodno razrijeđeni odgovarajućim diluentom. Određivanje se temelji na uspoređivanju potencijala nepoznate otopine s potencijalom standardne otopine poznate aktivnosti, a razlika potencijala između dviju elektroda posljedica je različite brzine difuzije iona ovisno o njihovoj koncentraciji.

Sve laboratorijske analize provedene su na automatiziranom biokemijskom analizatoru Cobas c501 (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska) uz korištene originalnih komercijalnih reagensa tvrtke Roche Diagnostics, Basel, Švicarska i prema uputama proizvođača.

Odgodena funkcija transplantata – DGF određena je kao potreba za nadomještanjem bubrežne funkcije dijalizom dulje od sedam dana nakon transplantacije. Kliničku odluku o provođenju dijalize donosio je Konzilij transplantacijskih nefrologa. Neposredna funkcija presatka IGF (engl. *immediate graft function*) određena je bez potrebe za dijalizom sedam dana po transplantaciji.

Individualna testna lista i organizacija istraživanja prikazani su tablično.

**Tablica 3.** Individualna testna lista

<b>INDIVIDUALNA TESTNA LISTA</b>	
<b>ISPITANICI</b>	<b>DARIVATELJI</b>
dob (godine)	spol (m/ž)
spol (m/ž)	dob (godine)
arterijska hipertenzija	BMI
kardiovaskularne bolesti u anamnezi	pušenje
cerebrovaskularne bolesti u anamnezi	DM
DM	darivatelj uzrok smrti
HLP	trauma
BMI	CVI
pušenje	srčani arest
osnovna bubrežna bolest	hipotenzivne atake
imunološke bolesti bubrega	predeksplantacijski kreatinin
DM i vaskularne bolesti bubrega	marginalni darivatelj
policiistična bolest bubrega	
razvojni poremećaji bubrega i kanalnog sustava	<b>TRANSPLANTACIJSKI PARAMETRI</b>
tubulointersticijski nefritisi	
endemska nefropatija	MM (broj 0-6)
nepoznato	hladna ishemija (sati)
dijaliza - hemodijaliza/peritonejska dijaliza	
duljina liječenja dijalizom (godine)	<b>POSTTRANSPLANTACIJSKI PARAMETRI</b>
RTG makrokalcifikati krvnih žila zdjelice da/ne	urca
von Kossa bojanje mikrokalcifikati da/ne	kreatinin
BMP-2 endotel (0,1,2,3)	kalij
BMP-2 VSMC (0,1,2,3)	24 satni volumen urina
BMP-7 endotel (0,1,2,3)	klirens kreatinina
BMP-7 VSMC (0,1,2,3)	

Legenda: DM = šećerna bolest, HLP = hiperlipoproteinemija, BMI = indeks tjelesne mase ( engl. *body mass index*), RTG = radiološki, BMP = koštani morfogenetski proteini (engl. *bone morphogenic proteins*), VSMA = vaskularne glatke mišićne stanice (eng. *vascular smooth muscle cells*), CVI= cerebrovaskularni infarkt, MM = nepodudarnost antigena HLA darivatelja i primatelja (engl. *Mismatch*)

**Tablica 4. Organizacija istraživanja**

<b>Klinički bolnički centar Zagreb</b>	<b>postupci</b>
Klinički odjel Klinike za unutarnje bolesti Zavod za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju – Referentni centar Ministarstva zdravlja za nadomještanje bubrežne funkcije, plazmaferezu i aferezu	Predtransplantacijska priprema Anamneza, fizikalni pregled, laboratorijska i RTG predoperativna dijagnostika Odluka o transplantacijskom liječenju; konzilij internist-nefrolog, urolog, anesteziolog
Zavod za tipizaciju tkiva – Referentni centar Ministarstva zdravstva za tipizaciju tkiva	Tipizacija leukocitnih antigena lokusa HLA A, HLA B i HLA DR ispitanika – primatelja i darivatelja bubrega, MM, PRA, CM testovi
Klinika za urologiju	Kirurški postupci transplantacije bubrega uz rutinsko podvezivanje donje epigastrične arterije tijekom postupka Postransplantacijsko liječenje urolog internist nefrolog
Klinika za patologiju i citologiju	Obrada vaskularnih preparata Bojenje von Kossa, imunohistokemijska bojanja za BMP-2, BMP-7, mikroskopiranje, bodovanje
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku – Referentni centar Ministarstva zdravstva za kliničku biokemiju i molekularnu dijagnostiku	Laboratorijski testovi za procjenu funkcije transplantiranog bubrega; određivanje vrijednosti uree, kreatinina, kalija iz krvnog seruma te klirensa kreatinina iz 24-satnog urina

Legenda: RTG = radiološki, HLA = leukocitni antigeni čovjeka (engl. *human leukocyte antigens*), MM = imunološka nepodudarnost HLA-A, HLA-B, HLA-DR lokusa primatelja i darivatelja (engl. *miss match*), PRA = panel reaktivnih protutijela (engl. *panel reactive antibodies*), CM = test križne reakcije limfocita darivatelja i seruma primatelja (engl. *crossmatch*), BMP = koštani morfogogenetski proteini (engl. *bone morphogenic proteins*)

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi podaci upisani su u program Microsoft Excel, Microsoft, USA, pročišćeni i pohranjeni u bazu. Statistička analiza provedena je pomoću Stata/SE 11.2 Windows (Stata Corp LP, USA).

Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirana je D'Agostino-Pearsonovim testom. Mjere centralne tendencije aritmetička su sredina i standardna devijacija za normalno raspodijeljene (dob) te medijan i interkvartilni raspon za varijable čija raspodjela odstupa od normalne (BMI, duljina liječenja dijalizom, MM). Normalno raspodijeljene varijable uspoređene su Studentovim t-testom, a za varijable čija raspodjela odstupa od normalne korišten je Mann-Whitneyjev U-test. Kategorijske varijable prikazane su kao apsolutni brojevi i proporcije (spol, pušenje, HLP, šećerna bolest, arterijska hipertenzija, kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti, osnovna bubrežna bolest, radiološki potvrđeni makrokalifikati, mikrokalifikati potvrđeni Von Kossa bojenjem, „marginalni“ darivatelj, DGF, IGF).

Za usporedbu kategorijskih varijabli i izraženosti BMP-2 i BMP-7 u endotelu i VSMC-u koristio se  $\chi^2$  test. Vrijednost p manja od 0,05 smatrala se statistički znatnom.

Za kontinuirane varijable čija raspodjela prati normalnu (dob, BMI, vrijeme hladne ishemije) korišten je Studentov t-test za neuparene uzorke, a za one čija raspodjela odstupa od normalne raspodjele (MM i duljina liječenja dijalizom) korišten je Mann-Whitney U-test.

U slučaju kategorijske zavisne varijable (izraženost BMP-2 i BMP-7 u endotelu i VSMC) korištena je logistička regresija, a u slučaju kontinuiranih varijabli korištena je linearna regresija.

Korelacije su testirane Pearsonovim i Spearmannovim testom, ovisno o normalnosti raspodjele. Korelacije između nominalnih varijabli ispitane su *Cramérovim V* testom korelacija. Korelacije između kontinuiranih varijabli u kojima je jedna opservirana, a jedna neopservirana testirane su poliserijskim korelacijama.

Korelacije više nezavisnih varijabli (spol, dob, pušenje, šećerna bolest, arterijska hipertenzija, HLP, kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti, osnovna bubrežna bolest, radiološki potvrđeni makrokalifikati, mikrokalifikati potvrđeni Von Kossa bojenjem, vrijeme hladne ishemije, MM, DGF, IGF) s jednom zavisnom kategorijskom varijablom (izraženost BMP-2 i BMP-7 u endotelnim i VSMC) ispitana je multivarijantnom logističkom regresijom. Varijable za koje se prilagodila regresijska analiza, tj. čimbenici zablude (engl. *confounder*) izabrane su racionalnom kliničkom prosudbom. Veličina učinka u logističkoj regresiji (engl. *effect size*) izražena je omjerom mogućnosti – OR (engl. *odds ratio*) praćen 95 %-tnim intervalom pouzdanosti (95 % CI). Kao mjera prikladnosti podudaranja (engl. *goodness-of-fit*) koristio se Hosmer-Lemeshowljevtest, a kao mjera prediktivnosti koeficijent regresije R<sup>2</sup> koji je mjera udjela objašnjene varijance u modelu.

Ispitali smo je li izraženost BMP-2 i BMP-7 u endotelnim i VSMC epigastrične arterije ispitanika neovisni prediktor rane funkcije transplantata. Izraženost BMP-2/BM-7 dihotomizirana je kao pozitivna (stupnjevi izraženosti 1, 2 i 3) ili negativna (bez izraženosti) i testirana u neprilagođenim i prilagođenim logističkim regresijskim modelima, uz prilagodbu za dob, spol, BMI, pušenje i anamnezu arterijske hipertenzije i šećerne bolesti (za ispitanike i darivatelje), duljinu liječenja dijalizom, vrijeme hladne ishemije, MM (OR, uz 95 % CI).

## 4. REZULTATI

### 4.1. OPĆA OBILJEŽJA ISPITANIKA I DARIVATELA

Prosječna dob 79 ispitanika je 51 +/- 14 godina (raspon 20 – 76 godina), 60 % muškaraca, 72 % pušača. Prosječno vrijeme liječenja dijalizom iznosi dvije godine (raspon 0,083 do 7 godina). Glomerulonefritis (40 %) i autosomno dominantna policistična bolest bubrega (13 %) najčešći su uzroci završnog stadija KBB-a. Četiri ispitanika (5 %) imaju šećernu bolest tipa 2, 86 % arterijsku hipertenziju, 41 % HLP, 12 % kardiovaskularnu/cerebrovaskularnu bolest. Vaskularne kalcifikacije predtransplantacijskom obradom zabilježene su u 57 % ispitanika. Prosječni BMI je 25,3 +/- 4,0 kg/m<sup>2</sup> (raspon 15,8 – 35,3 kg/m<sup>2</sup>); 39 (49 %) ispitanika ima normalnu tjelesnu težinu, 30 (38 %) je preuhranjenih, 10 (13 %) pretilih (temeljeno na klasifikaciji uhranjenosti Svjetske zdravstvene organizacije).

Prosječna dob darivatelja je 51 +/- 10 godina (raspon 23 – 76) godina, 38 % muškaraca, 4 % sa šećernom bolesti, 49 % s arterijskom hipertenzijom, 36 % pušača. 40 % je darivatelja po proširenim kriterijima.

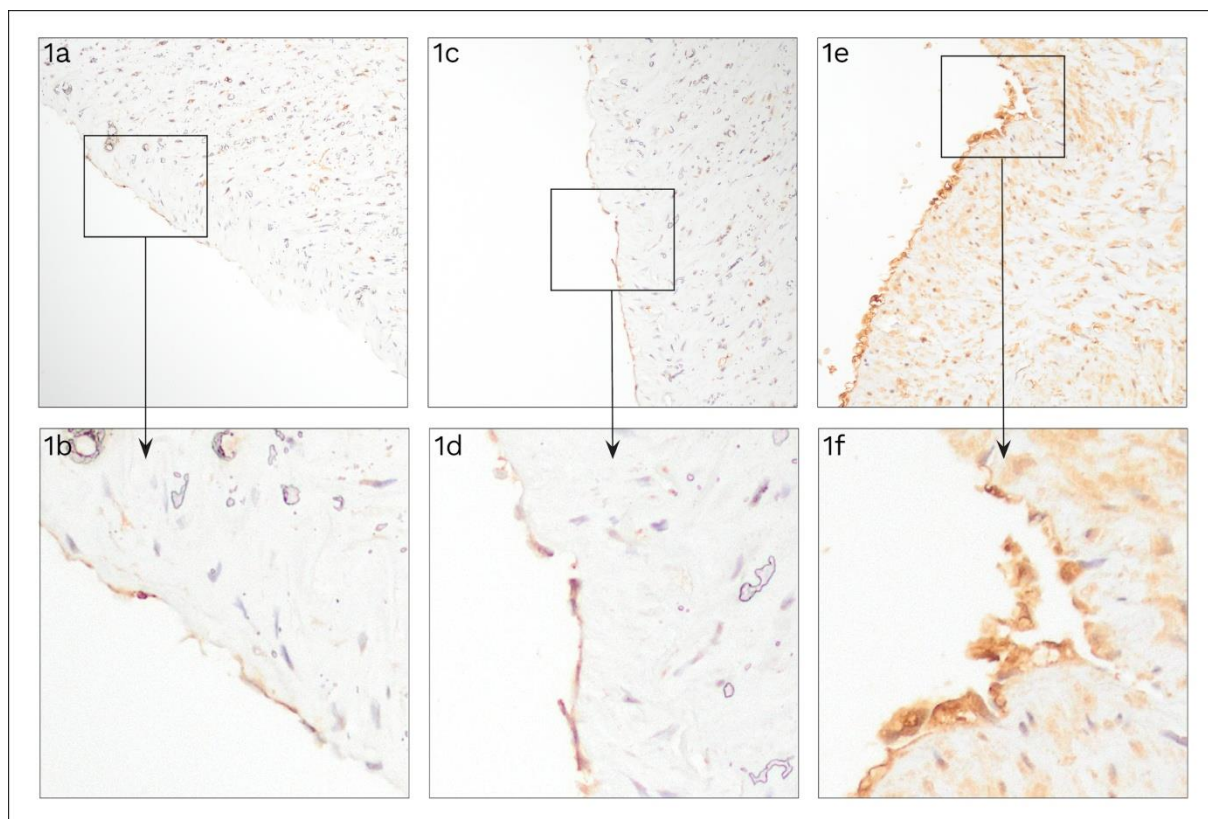
Imunološka podudarnost ispitanika i darivatelja raspona je 1 do 5, medijan 3. Dva ispitanika su senzibilizirana s PRA 6 % i 12 %.

Hladna ishemija iznosi 13,4 sata +/- 5,1, s rasponom od 2,5 do 23,8 sati.

Nije bilo razlike u spolu ili dobi između ispitanika i kontrola; od 16 kontrolnih ispitanika 62 % je muškaraca, prosječna dob 56 godina, 58 % hipertoničara.

### 4.2. IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7 U ENDOTELNIM STANICAMA I VSMC ARTERIJA ISPITANIKA I KONTROLA

Analizirano je 500 stanica svakog uzorka u osam polja pri povećanju od 400 puta. Semikvantitativnom procjenom izraženost BMP-ova u citoplazmama endotelnih i VSMC arterija stupnjevana je: nema izraženosti, izraženost prvog, drugog ili trećeg stupnja.



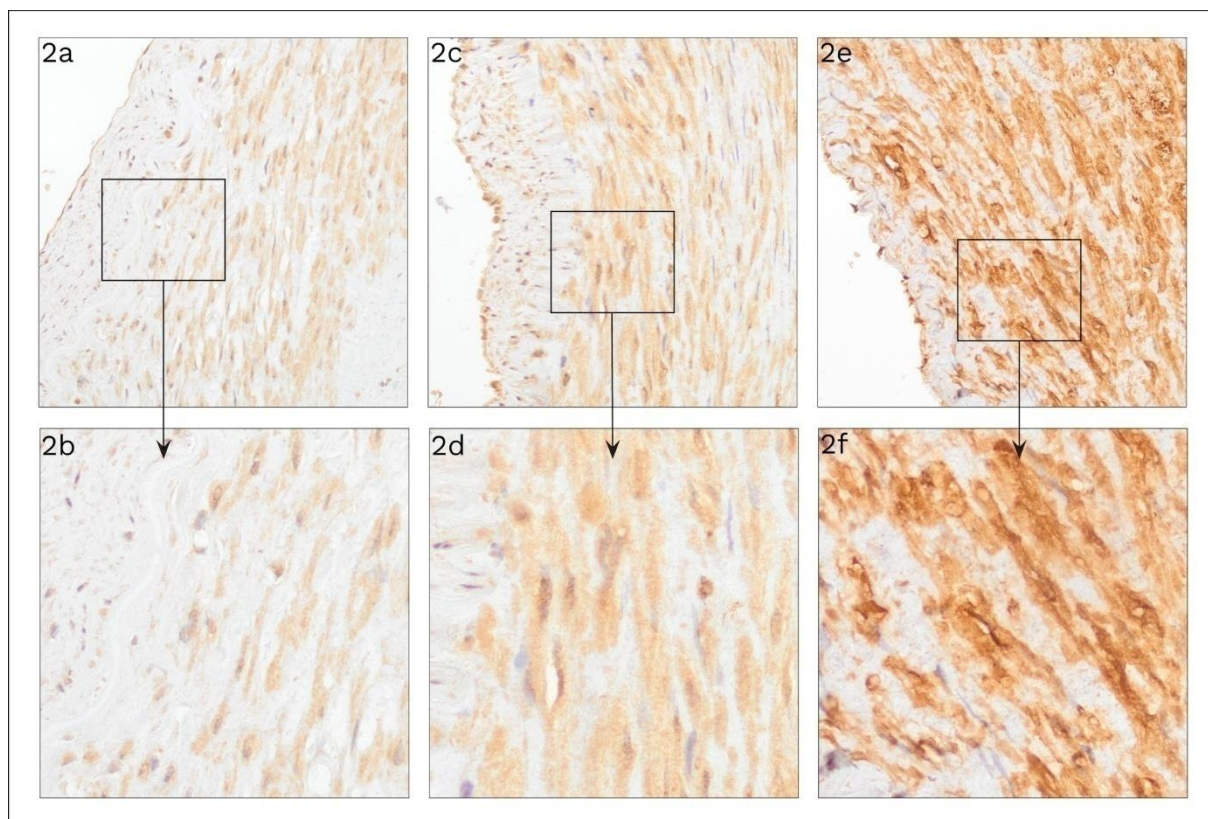
**Slika 1.** Izraženost BMP-a u endotelnim stanicama arterija.

Reprezentativne fotografije izraženosti BMP-ova u endotelnim stanicama.

Slike 1a, 1c, 1e uvećanje x 20, slike 1b, 1d, 1f uvećanje x 63.

Prisutnost BMP-a vidljivo je smeđim obojenjem citoplazme stanice. Stupnjevanje izraženosti BMP-a u stanicama prema % stanica smeđe obojene citoplazme; stupanj 1 (1a, 1b) 10 – 49 % stanica; stupanj 2 (1c, 1d) 50 – 74 % stanica; stupanj 3 (1e, 1f) više od 75 % stanica smeđe obojene citoplazme.





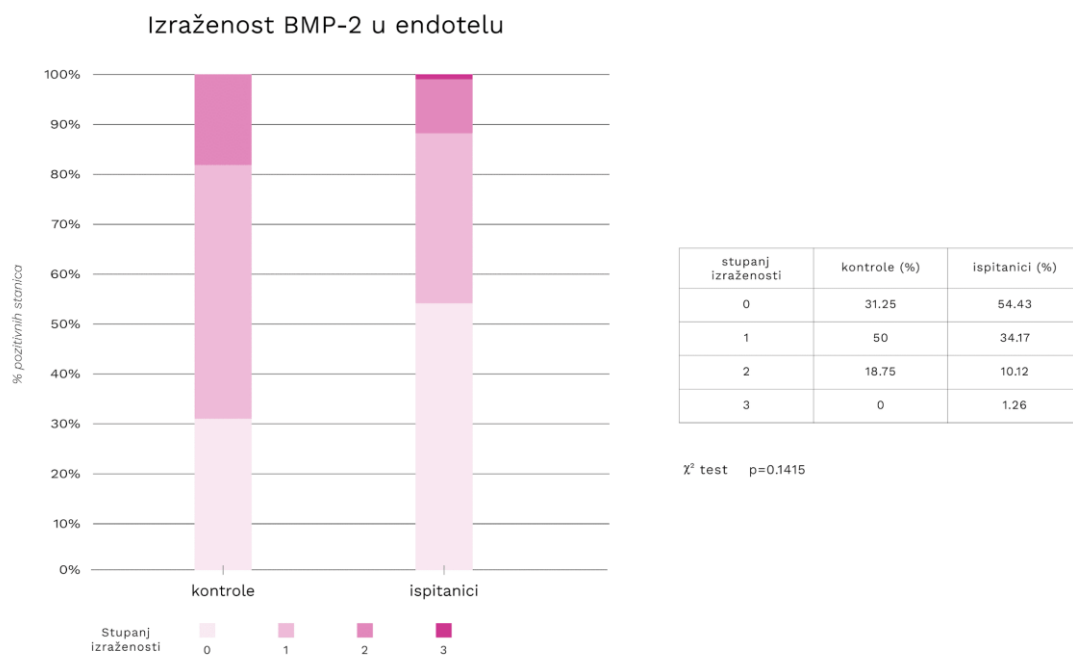
**Slika 2.** Izraženost BMP-a u VSMC arterija.

Reprezentativne fotografije izraženosti BMP-ova u endotelnim stanicama.

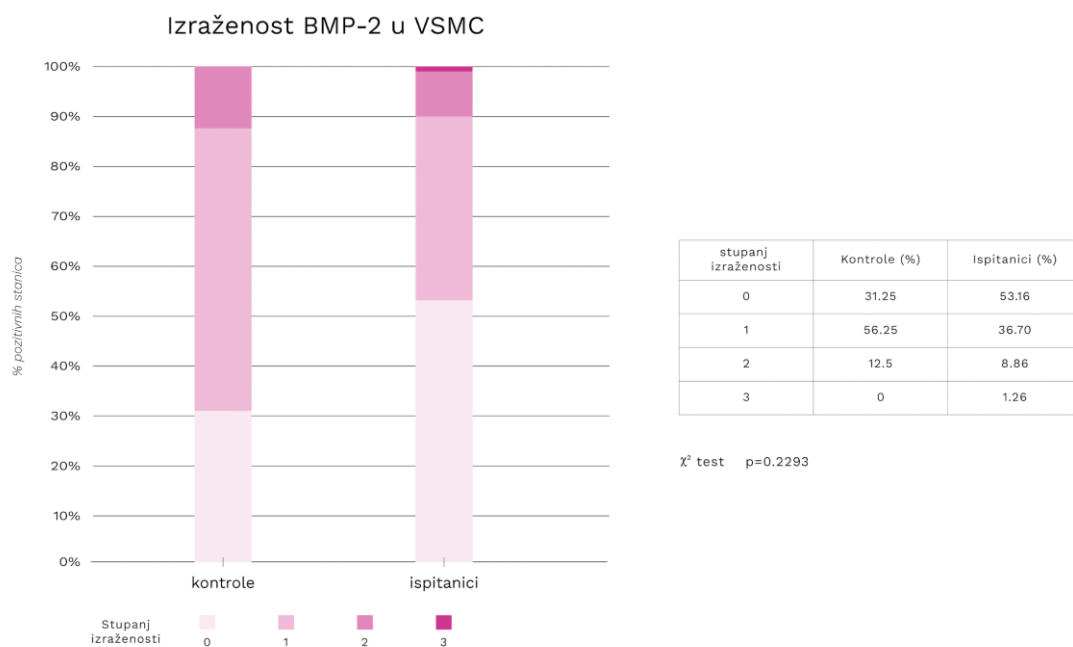
Slike 2a, 2c, 2e uvećanje x 20, slike 2b, 2d, 2f uvećanje x 63.

Prisutnost BMP-a vidljivo je smeđim obojenjem citoplazme stanice. Stupnjevanje izraženosti BMP-a u stanicama prema % stanica smeđe obojene citoplazme; stupanj 1 (2a, 2b) 10 – 49 % stanica; stupanj 2 (2c, 2d) 50 – 74 % stanica; stupanj 3 (2e, 2f) više od 75 % stanica smeđe obojene citoplazme.

BMP-2 slabije je izražen u endotelnim i VSMC arterija ispitanika nego u kontrolnoj skupini, ali nije dosegnuta statistička važnost (endotel  $\chi^2$  p=0,1415; VSMC  $\chi^2$  p=0,2293).

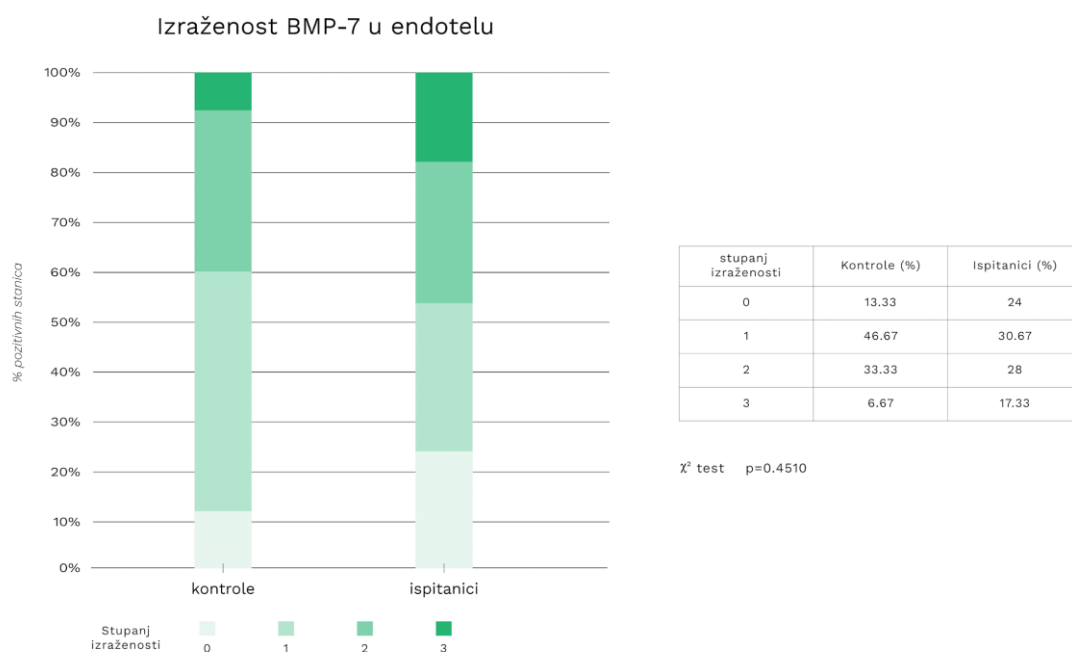


**Slika 3.** Grafički prikaz izraženosti BMP-2 u endotelnim stanicama arterija ispitanika i kontrolne skupine.

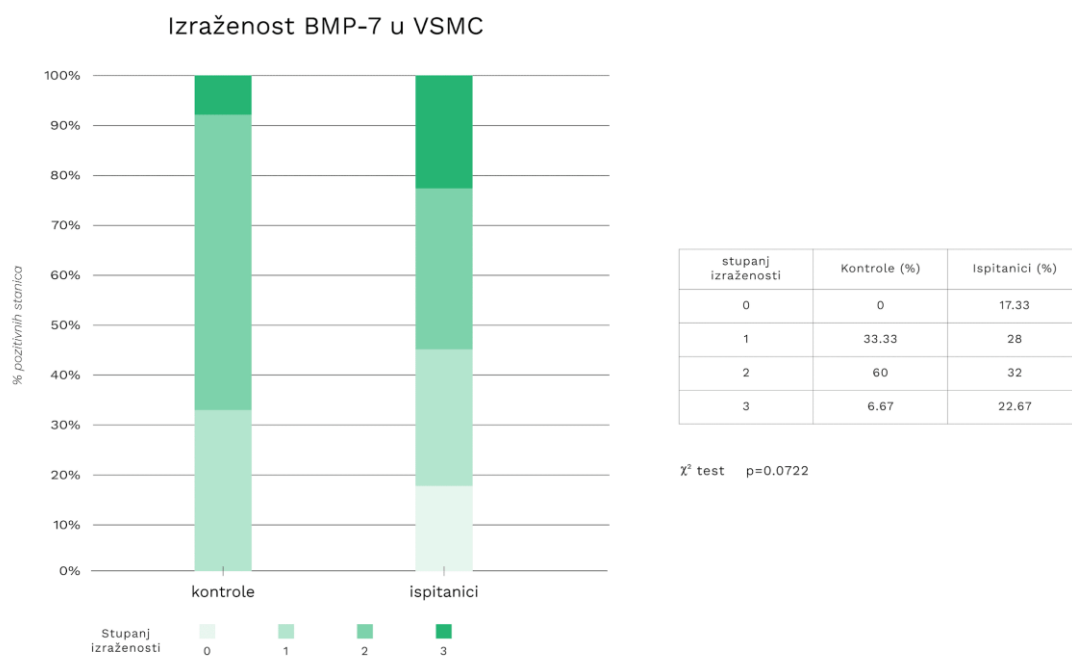


**Slika 4.** Grafički prikaz izraženosti BMP-2 u VSMC arterija ispitanika i kontrolne skupine.

BMP-7 podjednako je izražen u endotelnim i VSMC arterija ispitanika i kontrolne skupine (endotel  $\chi^2$  p=0,4510; VSMC  $\chi^2$  p=0,0722).



**Slika 5.** Grafički prikaz izraženosti BMP-7 u endotelnim stanicama arterija ispitanika i kontrolne skupine.



**Slika 6.** Grafički prikaz izraženosti BMP-7 u VSMC arterija ispitanika i kontrolne skupine.

Izraženost BMP-2 i BMP-7 u endotelnim i VSMC arterija ispitanika povezana je s duljinom liječenja dijalizom. Dulje liječenje dijalizom povezano je s manjom izraženošću BMP-2 i u endotelnim (poliserijsko  $\rho=-0.1559$ ,  $p=0.0419$ ) i u VSMC-u (poliserijsko  $\rho=-0.1954$ ,  $p=0.0843$ ) i većom izraženošću BMP-7 i u endotelnim (poliserijsko  $\rho=0.2154$ ,  $p=0.0062$ ) i u VSMC arterija (poliserijsko  $\rho=0.3226$ ,  $p=0.0047$ ).

Izraženost BMP-2 i BMP-7 nije povezana sa spolom, dobi, osnovnom bubrežnom bolesti, tipom dijalize (HD, PD), pušenjem, HLP-om, BMI-jem, arterijskom hipertenzijom, kardiovaskularnim ili cerebrovaskularnim bolestima u anamnezi. S obzirom na mali broj bolesnika sa šećernom bolesti (4), statistička analiza nije se mogla učiniti.

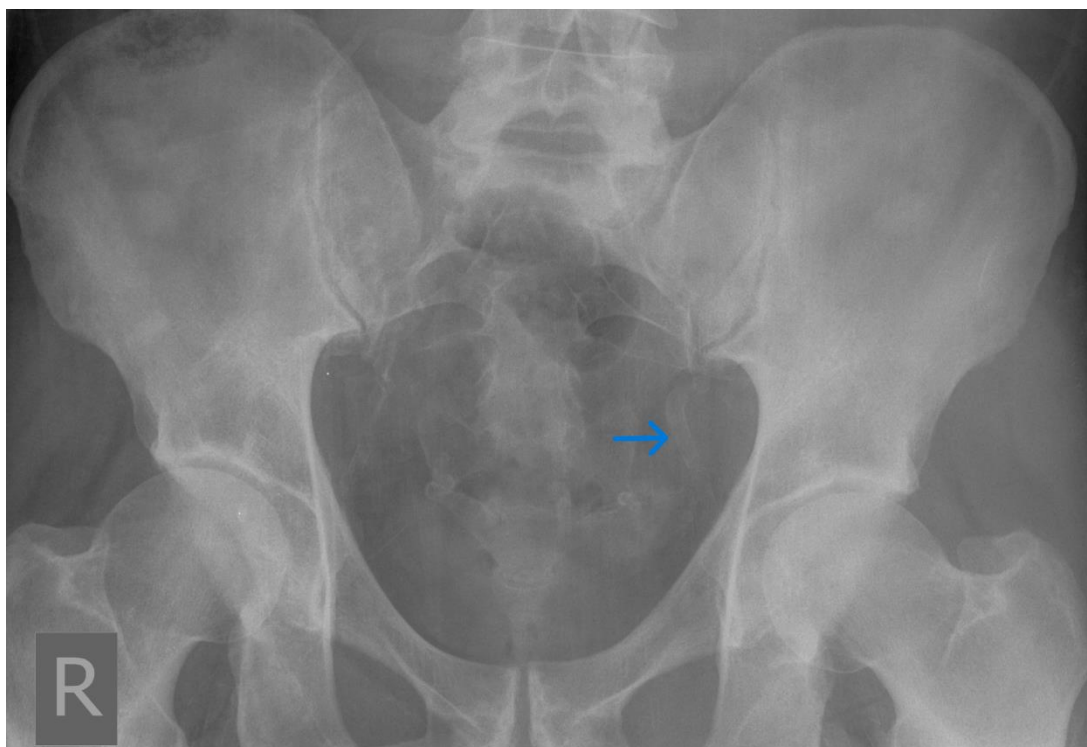
#### 4.3. VASKULARNI KALCIFIKATI I IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7

##### 4.3.1. RADIOLOŠKI VERIFICIRANI VASKULARNI KALCIFIKATI I IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7

U 45 (57 %) ispitanika radiološki su potvrđeni makrokalcifikati u vaskulaturi zdjelične regije.

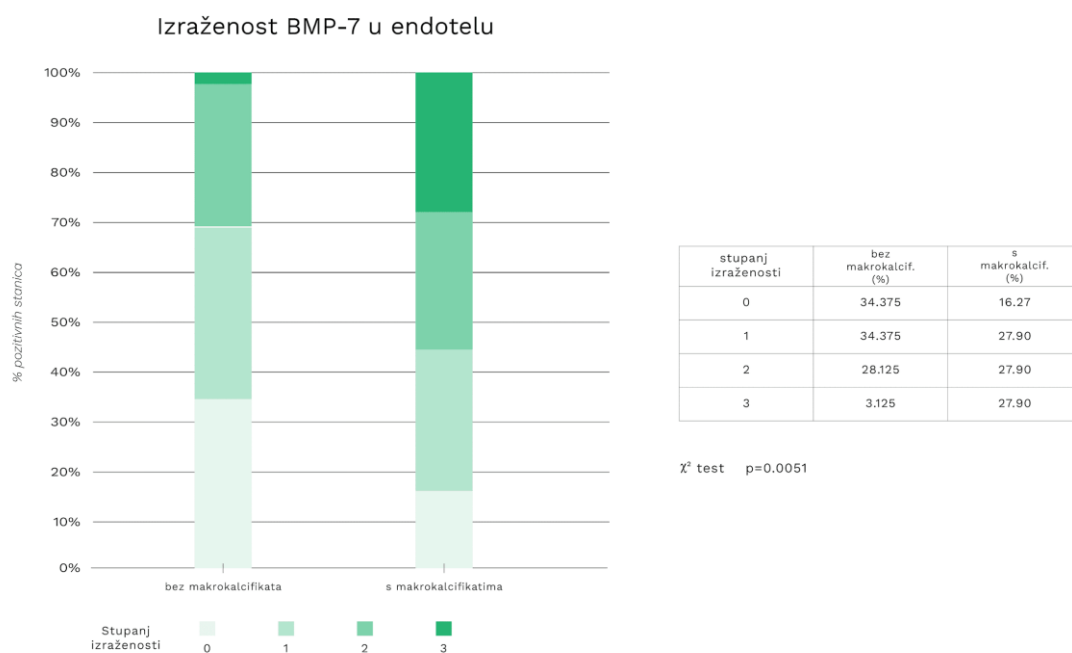


**Slika 7.** Radiološka snimka donjeg abdomena i male zdjelice bez vaskularnih kalcifikata.



**Slika 8.** Radiološka snimka donjeg abdomena i male zdjelice sa vaskularnim kalcifikatima. Kalcifikati su označeni plavom strelicom.

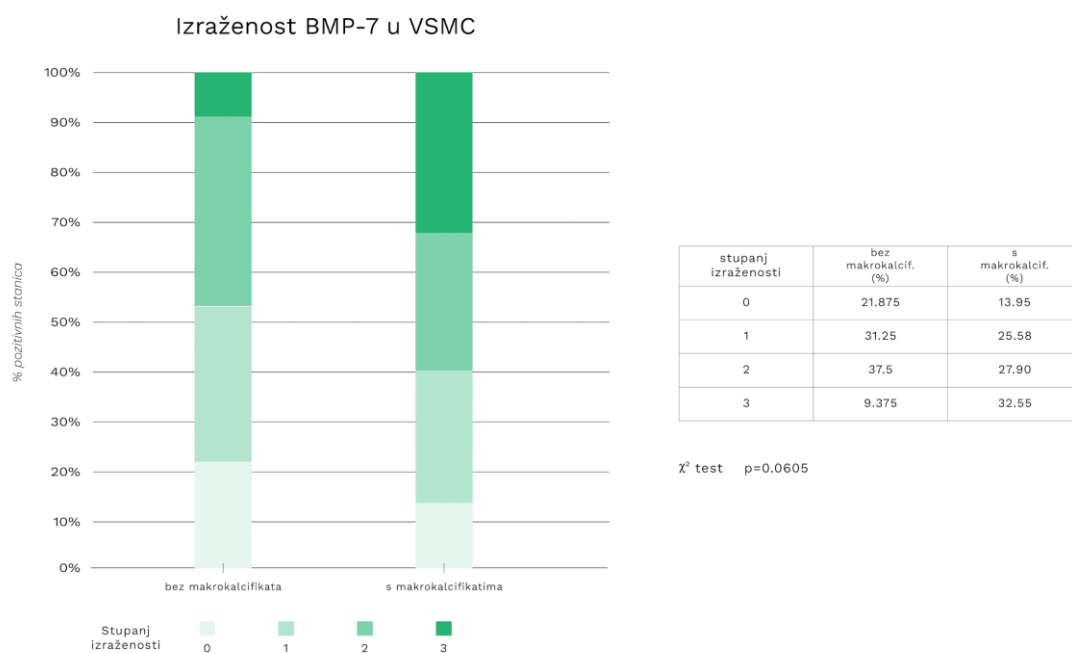
Izraženost BMP-2 u endotelu i VSMC-u epigastrične arterije podjednaka je u ispitanika s radiološki potvrđenim vaskularnim kalcifikatima i bez njih, a izraženost BMP-7 u endotelu statistički je znatno veća u ispitanika s radiološki potvrđenim vaskularnim kalcifikatima ( $\chi^2$   $p=0.0051$ ). Od 34 ispitanika bez kalcifikata izraženost BMP-7 stupnja 3 verificirana je u samo jednog ispitanika, a od 45 ispitanika s kalcifikatima izraženost BMP-7 stupnja 3 verificirana je u 12 ispitanika (3 % prema 27 %).



**Slika 9.** Grafički prikaz izraženosti BMP-7 u endotelnim stanicama arterija u ispitanika s radiološki potvrđenim kalcifikatima krvnih žila zdjelice i bez njih.

Najjači stupanj izraženosti (stupanj 3) BMP-7 u endotelnim stanicama arterija povezan je s 18 puta većim izgledom za radiološki potvrđene vaskularne kalcifikate u odnosu na ispitanike u kojih BMP-7 uopće nije izražen, uz kontrolu za ostale potencijalne čimbenike utjecaja, i to duljinu liječenja dijalizom, HLP, povećan BMI, pušenje te anamnezu kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti.

Izraženost BMP-7 u VSMC arterija veća je u ispitanika s radiološki potvrđenim makrokalcfikatima arterija zdjelice nego u onih bez njih, ali nije dosegla statističku važnost ( $\chi^2$  p=0.0605).



**Slika 10.** Grafički prikaz izraženosti BMP-7 u VSMC arterija u ispitanika s radiološki potvrđenim kalcifikatima krvnih žila zdjelice i bez njih.

Radiološki potvrđeni kalcifikati krvnih žila zdjelice statistički su znatno povezani s dobi, pušenjem, HLP-om i duljinom liječenja dijalizom. Rizik za razvoj kalcifikacija raste 6 % za svaku godinu života, dok je kod pušača rizik za razvoj kalcifikata četiri puta veći nego u nepušača (95 % interval pouzdanosti 1,1-18,  $p < 0,001$ ) kontrolirano za spol, BMI, arterijsku hipertenziju i duljinu liječenja dijalizom. Radiološki potvrđene kalcifikate krvnih žila zdjelice ima 85 % ispitanika s HLP-om naspram 38 % ispitanika bez HLP-a; rizik za kalcifikate 2,3 puta je veći u bolesnika s HLP-om (95 % interval pouzdanosti 1,5-3,4,  $p < 0,001$ ). Dulje liječenje dijalizom povezano je sa statistički znatno većom učestalosti makrokalcfikata (T test s Welchovom korekcijom  $p=0.0170$ ); ispitanici s makrokalcfikatima prosječno su liječeni dijalizom 3,2 godine, a oni bez njih 1,9 godina.

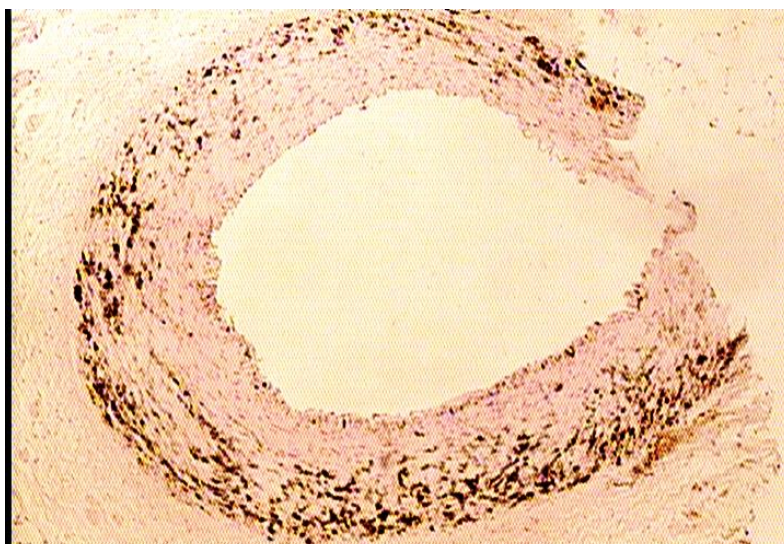
#### 4.3.2. VON KOSSA BOJENJEM POTVRĐENI VASKULARNI KALCIFIKATI I IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7

Von Kossa bojenjem potvrđeni su mikrokalcfikati u VSMC epigastrične arterije ispitanika te renalne arterije kontrola (Slika 11). Izraženost mikrokalcfikata i u ispitanika i u kontrolnoj skupini vrlo je mala, ne razlikuje se statistički znatno u ovim dvjema skupinama.



MikrokalCIFikati potvrđeni Von Kossa bojenjem nisu povezani s izraženošću BMP-2 i BMP-7 u endotelnim i VSMC arterija.

MikrokalCIFikati su potvrđeni u 16,5 % ispitanika, a njihova prisutnost nije povezana sa spolom, dobi, pušenjem, BMI-jem, HLP-om, arterijskom hipertenzijom, kardiovaskularnim ili cerebrovaskularnim bolestima u anamnezi. Od 45 ispitanika s radiološki potvrđenim makrokalCIFikatima zdjeličnih arterija u samo devet bolesnika (20 %) potvrđeni su i mikrokalCIFikati Von Kossa bojenjem. Obratno, kod ispitanika s pozitivnim bojenjem za mikrokalCIFikate čak 60 % (9 od 15) ima i radiološki potvrđene makrokalCIFikate. Četiri bolesnika s anamnezom šećerne bolesti ima radiološki potvrđene makrokalCIFikate, ali nijedan nema mikrokalCIFikate dokazane Von Kossa bojenjem.



**Slika 11.** Vaskularni mikrokalCIFikati VonKossa bojenje.

Reprezentativna fotografija kalCIFikata u stijenci epigastrične arterije, uvećanje x 10.

Prisutnost kalCIFikata vidljiva je kao crno obojenje stanice.

#### 4.4 ODGOĐENA FUNKCIJA TRANSPLANTATA I IZRAŽENOST BMP-2 i BMP-7

Ispitanici su prema funkciji transplantiranog bubrega podijeljeni u dvije skupine: IGF i DGF; 19 % ispitanika (15 od 79) ima DGF. Nije bilo znatnih razlika u općim karakteristikama ispitanika s IGF-om i DGF-om (Tablice 5 i 6).



**Tablica 5.** Karakteristike ispitanika s IGF-om i DGF-om.

Rezultati su prikazani kao broj ispitanika (%), aritmetička sredina +- standardna devijacija ili medijan (interkvartilni raspon)

	Promptna funkcija IGF (N 64)	Odgodena funkcija DGF (N 15)	statistika
muški spol	37 (58)	11 (73)	$\chi^2=1,23$ , $p=0,268$
dob	50,7 +- 13,4	51,3 +- 15,2	$t=-0,148$ , $p=0,883$
duljina liječenja dijalizom (godine)	2 (1-4)	2 (2-4)	$z=-1,28$ , $p=0,201$
BMI	25,3 +- 4,0	25,2 +- 4,2	$t=0,081$ , $p=0,936$
CRP mg/L	1,25 (0,4-4)	2,5 (1-3)	$z=-1,52$ , $p=0,128$
HD/PD	47 (75) / 16 (25)	13 (87) / 2 (13)	$\chi^2=0,993$ , $p_{\text{Fisher}}=0,498$
pušenje	19 (30)	4 (27)	$\chi^2=0,054$ , $p_{\text{Fisher}}=1,00$
HLP	27 (42)	6 (40)	$\chi^2=0,024$ , $p=0,877$
DM	3 (5)	1 (7)	$\chi^2=0,099$ , $p_{\text{Fisher}}=0,577$
arterijska hipertenzija	55 (86)	13 (87)	$\chi^2=0,005$ , $p_{\text{Fisher}}=1,00$
kardiovaskularne bolesti	6 (9)	0	$\chi^2=1,250$ , $p_{\text{Fisher}}=0,589$
aritmija	5 (8)	0	$\chi^2=1,250$ , $p_{\text{Fisher}}=0,577$
valvularna bolest	1 (2)	0	$\chi^2=0,237$ , $p_{\text{Fisher}}=1,00$
RTG kalcifikati	36 (56)	9 (60)	$\chi^2=0,070$ , $p_{\text{Fisher}}=0,792$
osnovna bubrežna bolest			
imunološke	23 (36)	9 (60)	$\chi^2=2,920$ , $p=0,088$
DM i vaskularne bolesti	10 (16)	0	$\chi^2=2,680$ , $p_{\text{Fisher}}=0,194$
policistoza	8 (13)	2 (13)	$\chi^2=0,008$ , $p_{\text{Fisher}}=1,00$
razvojni poremećaji	5 (8)	2 (13)	$\chi^2=0,459$ , $p_{\text{Fisher}}=0,612$
TIN	12 (19)	1 (7)	$\chi^2=1,291$ , $p_{\text{Fisher}}=0,443$
endemska	2 (3)	0	$\chi^2=0,481$ , $p_{\text{Fisher}}=1,00$
nepoznato	4 (6)	1 (7)	$\chi^2=0,004$ , $p_{\text{Fisher}}=1,00$

Legenda: TIN = tubulo intersticijski nefritis, DM = šećerna bolest, RTG = radiološki, HLP = hiperlipoproteinemija, BMI = indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*), CRP = C reaktivni protein, HD = hemodijaliza, PD = peritonealna dijaliza

**Tablica 6.** Karakteristike darivatelja ispitanika s IGF-om i DGF-om.

Rezultati su prikazani kao broj ispitanika (%), aritmetička sredina +- standardna devijacija ili medijan (interkvartilni raspon)

	Promptna funkcija IGF (N 64)	Odgođena funkcija DGF (N 15)	statistika
muški spol	24 (38)	6 (40)	$\chi^2=0,032$ , $p=0,857$
dob	50,8 +- 10,4	54,5 +- 7,8	$t=-0,129$ , $p=0,202$
BMI	26,5 +- 2,9	26,5 +- 2,7	$t=-0,078$ , $p=0,938$
pušenje*	21 (37)	4 (31)	$\chi^2=0,170$ , $p_{\text{Fisher}}=0,759$
DM	1 (2)	2 (13)	$\chi^2=4,610$ , $p_{\text{Fisher}}=0,091$
arterijska hipertenzija	29 (45)	10 (67)	$\chi^2=2,220$ , $p=0,137$
Darivatelj uzrok smrti **			
trauma	14 (22)	3 (20)	$\chi^2=0,035$ , $p_{\text{Fisher}}=1,00$
CVI	48 (76)	12 (80)	$\chi^2=0,099$ , $p_{\text{Fisher}}=1,00$
srčani arest	11 (17)	1 (7)	$\chi^2=1,084$ , $p_{\text{Fisher}}=0,443$
hipotenzivne atake	12 (19)	2 (13)	$\chi^2=0,269$ , $p_{\text{Fisher}}=1,00$
marginalni donor ***	22 (34)	9 (60)	$\chi^2=3,347$ , $p=0,067$
MM (broj)	3 (2-4)	3 (2-4)	$z=-0,053$ , $p=0,958$
hladna ishemija (sati)	12,9 +- 5,2	14,5 +- 5,9	$t=-1,050$ , $p=0,297$

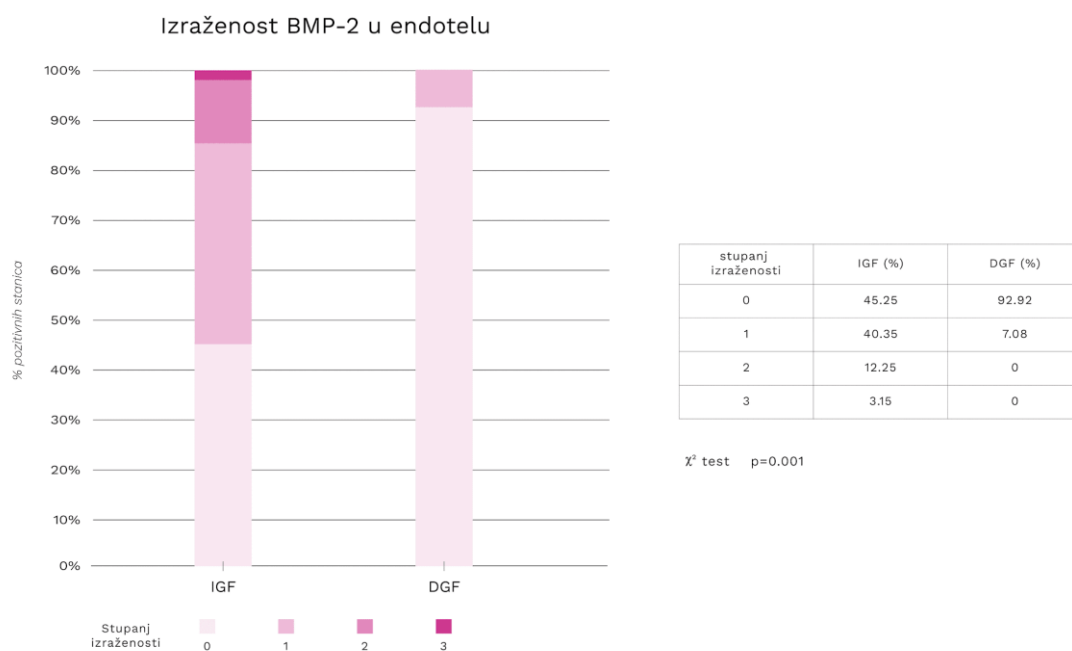
\* Za 9 donora pušački status bio je nepoznat.

\*\* Uzroci smrti darivatelja su cerebrovaskularni inzult i trauma, a u jednog darivatelja tumor mozga. Jedan donora nema uzrok smrti (obiteljska transplantacija – majka).

\*\*\* (41)

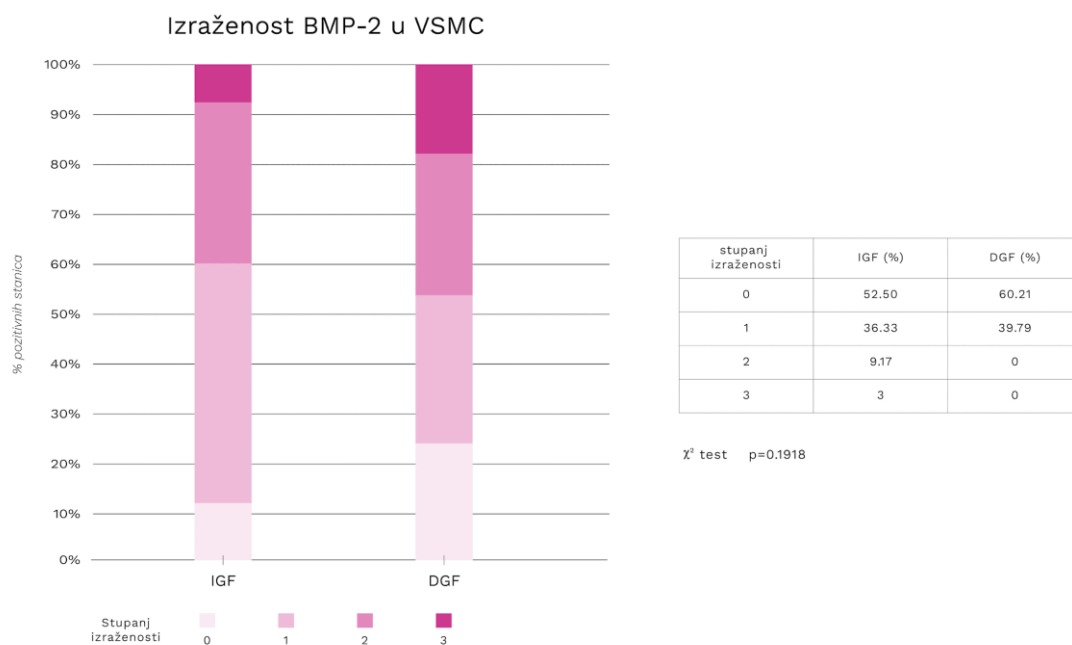
Legenda: DM = šećerna bolest, BMI = indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*), CVI = cerebrovaskularni inzult, MM = imunološka nepodudarnost HLA-A,HLA-B,HLA-DR lokusa primatelja i darivatelja (engl. *miss match*).

U ispitanika s DGF-om izraženost BMP-2 u endotelnim stanicama epigastrične arterije statistički je znatno manja nego u ispitanika s IGF-om. U 93 % ispitanika s DGF-om BMP-2 u endotelu nije bio izražen, u usporedbi s 45 % ispitanika u skupini IGF ( $\chi^2$   $p = 0,001$ ), izraženost 1. stupnja iznosila je 7 % prema 41 % u ovim dvjema skupinama ispitanika ( $\chi^2$   $p = 0,013$ ). Izraženost 2. i 3. stupnja nije zabilježena u ispitanika s DGF-om, u usporedbi s 13 % i 2 % u ispitanika s IGF-om.



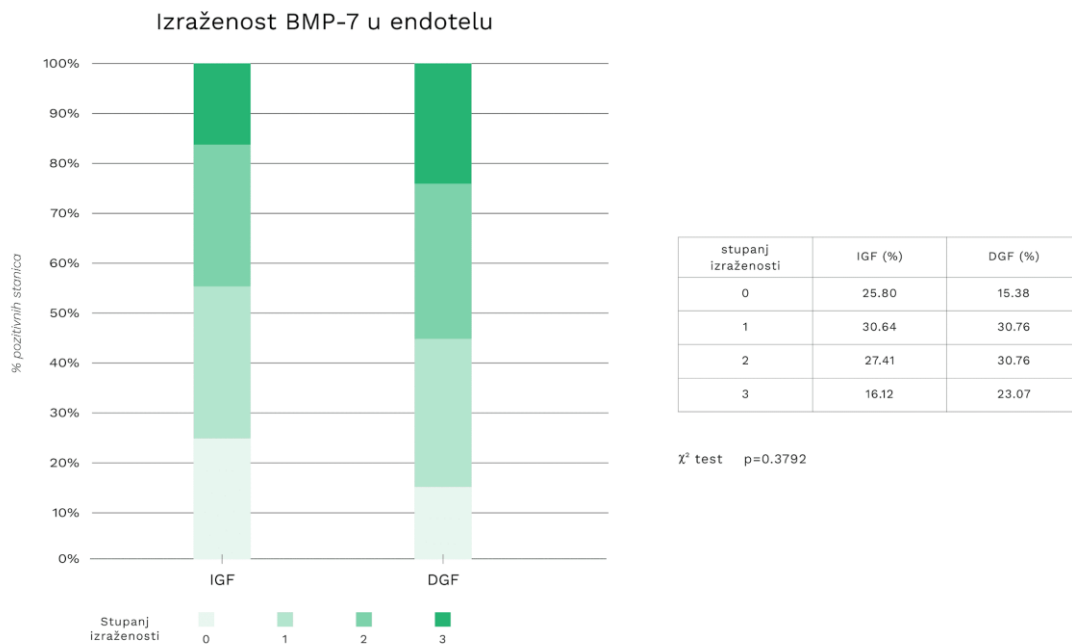
**Slika 12.** Grafički prikaz izraženosti BMP-2 u endotelnim stanicama arterija IGF/DGF.

Iako je zamiječena manja izraženost BMP-2 u VSMC epigastrične arterije u skupini ispitanika s DGF-om u usporedbi s IGF-om, nije dosegla statističku važnost ( $\chi^2$  p = 0.1918).

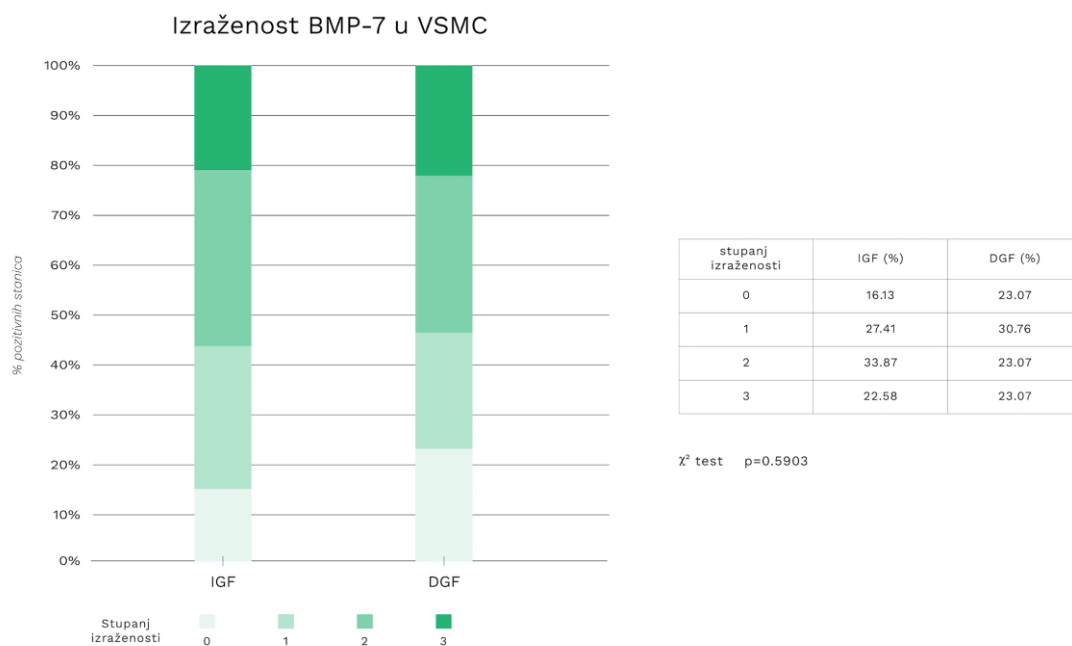


**Slika 13.** Grafički prikaz izraženosti BMP-2 u VSMC-u IGF/DGF.

Izraženost BMP-2 dihotomizirana je kao pozitivna (stupnjevi 1, 2 i 3) ili negativna (nema izraženosti) i testirana u neprilagođenim i prilagođenim logističkim regresijskim modelima. Ispitanici s pozitivnim BMP-2 u endotelnim stanicama arterija imali su manje izgleda za DGF nakon transplantacije (OR 0.059 [0.007, 0.477]), i to je ostalo statistički važno i nakon prilagodbe za dob, spol, BMI, pušenje i anamnezu arterijske hipertenzije, šećerne bolesti, kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti (za ispitanike i darivatelje), duljinu liječenja dijalizom, vrijeme hladne ishemije, MM (OR 0.038 [0.003, 0.492]). S druge strane, pozitivan BMP-2 u VSMC arterija nije povezan s ranom funkcijom transplantata ni prije (OR 1.41 [0.45, 4.42]) ni nakon prilagodbe za višestruke kovarijante (OR 0.86 [0.23, 3.26]). Ispitali smo i podudarnost između izraženosti BMP-2 i u endotelnim i u VSMC arterija. Konkordantna izraženost nađena je u 82,2 % ispitanika, a veća je u IGF nego u DGF skupini (87,7 % naspram 66,7 %,  $p = 0,046$ ). U skupini s IGF-om 40,0 % ispitanika ima pozitivan BMP-2 i u endotelnim i u VSMC arterija, dok ih u skupini s DGF-om ima 7,1 %. Ispitanici s konkordantnom izraženosti BMP-2 imaju niže i neprilagođene (OR 0.11 [0.01, 0.87]) i prilagođene koeficijente za DGF (OR 0.08 [0.01, 0.95]). Za razliku od BMP-2, izraženosti BMP-7 u endotelnim ( $\chi^2 p=0,3792$ ), u VSMC epigastričnih arterija ( $\chi^2 p=0,5903$ ), kao i konkordantna izraženost nije se razlikovala u ispitanika s DGF-om i onih s IGF-om (slika 14 i 15).



**Slika 14.** Grafički prikaz izraženosti BMP-7 u endotelnim stanicama arterija IGF/DGF.



**Slika 15.** Grafički prikaz izraženosti BMP-7 u VSMC arterija IGF/DGF.

Radiološki potvrđeni kalcifikati krvnih žila zdjelice nisu povezani s DGF-om i IGF-om, kao ni mikrokalcifikati obojeni Von Kossa metodom.

Prosječna je duljina hospitalizacije u cijeloj skupini 12 dana (raspon 7 – 90 dana), s interkvartilnim rasponom od 10 do 19 dana. Hospitalizacija je bila više od dva puta dulja u ispitanika s DGF-om u usporedbi s bolesnicima s IGF-om (medijan 28 dana, interkvartilni raspon 18 – 33 dana vs 12 dana, 9 – 16 dana,  $P < 0,001$ ).

## 5. RASPRAVA

Transplantacija bubrega optimalno je liječenje bolesnika sa završnim stadijem KBB-a. Ishod ovog liječenja ovisi o karakteristikama primatelja i darivatelja bubrega, njihovim komorbiditetima (prihvatljivim za transplantacijsko liječenje), kirurškim tehnikama, imunologiji transplantacije i hladnoj ishemiji (36).

Kardiovaskularna patologija primatelja bubrega jedan je od čimbenika koji mogu utjecati na transplantacijski ishod (142). Više biomarkera KBB-a, kao što su kalcij, fosfor, alkalna fosfataza, PTH, faktor rasta fibroblasta–FGF 23, Klotho, vitamin D3, OPG, sklerostin, HLP, endotelna disfunkcija povezana s kroničnom upalom i aktivacija renin-angiotenzinskog sustava uključeni su u patogenezu ateroskleroze u KBB-u, nastanak i opsežnost vaskularnih kalcifikacija (141). Uspješnost transplantacijskog liječenja ovisi o opsežnosti vaskularnih kalcifikata koji otežavaju stvaranje vaskularnih anastomoza. Nastanak vaskularnih kalcifikata aktivan je proces sličan modeliranju kosti u kojem uz mnogobrojne proupalne, profibrozirajuće i prokalcificirajuće molekule sudjeluju i BMP-ovi. Signalizacija BMP odvija se u mnogobrojnim stanicama koje sudjeluju u nastanku vaskularnih kalcifikata: endotelnim, VSMC, miofibroblastima i monocitima (143).

Velik broj istraživanja povezuje BMP-2 s nastankom vaskularnih kalcifikata (132, 144). Ubrzano starenje krvožilnog sustava u KBB-u posljedica je kronične upale. Na molekularno-staničnoj razini karakteriziraju je oksidativne, metaboličke i/ili toksične stanične ozljede. Ozljeđene endotelne stanice povećano proizvode izvanstanične vezikule koje imaju prokoagulantne i prokalcificirajuće aktivnosti; jedna od njih je osteohondrogena diferencijacija VSMC-a posredovana BMP-2 (145). BMP-2 u KBB-u moguće predstavlja molekularnu vezu između oksidativnog stresa i kalcifikacije koja dovodi do krutosti arterija. *In vitro*, u modelu oksidativnog stresa zabilježeno je povećanje ekspresije BMP-2 ovisno o vremenu i dozi i u endotelnim stanicama, i u VSMC-u (144). Razina BMP-2 povećana je u krvi, ali i u stijenci aorte u životinjskom modelu KBB-a (133).

Više literaturnih navoda predlaže da, za razliku od BMP-2, BMP-7 ometa nastanak vaskularnih kalcifikata. BMP-7 utječe na diferencijaciju monocita u makrofage u ranoj fazi ateroskleroze. Inhibira diferencijaciju u proupalne makrofage M1 i potiče diferencijaciju u protuupalne makrofage M2. Ovo palijativno, citoprotektivno djelovanje BMP-7 karakteristično je za vrlo ranu fazu ateroskleroze, no ako se stvara aterosklerotski plak, BMP-

7 ne usporava progresiju aterosklerotskog plaka i nastanak vaskularnih kalcifikata (101). Ipak nisu svi literaturni podatci jednoznačni; aterosklerotski plakovi u intimi i mediji renalnih arterija bolesnika s KBB-om pokazali su znatnu izraženost BMP-2, ali i BMP-7 (140).

Neželjeni događaj u transplantacijskom liječenju jest DGF, kada je potrebno nastaviti dijalizno liječenje dulje od sedam dana nakon transplantacije bubrega (82). Učestalost je DGF-a 19 – 40 % (68 – 70). Patofiziološka je podloga DGF-a ishemijsko-reperfuzijska ozljeda koja je neizbježna kod transplantacijskog postupka. Lezijski procesi biokemijskog podrijetla povezani su s oksidativnim stresom, a imunološkog podrijetla povezani su s regrutiranjem, aktivacijom i proliferacijom imunoloških stanica. Tipične histološke lezije jesu tubularna nekroza i intersticijski edem (66, 146). DGF povećava rizik za druge nepoželjne akutne i kronične događaje; infektivne komplikacije, odbacivanje transplantata, razvoj fibroze koji za posljedicu imaju lošiju funkciju transplantata (72).

Mnoga istraživanja o rizičnim čimbenicima za nastanak DGF-a upućuju da je učestalija kod starijih darivatelja, darivatelja s proširenim kriterijima, duljeg vremena hladne ishemije (90) te više HLA nepodudarnosti (osobito u lokusu HLA-DR) primatelja i darivatelja. Povećan rizik za DGF imaju stariji primatelji, primatelji sa šećernom bolesti, pretili, dulje liječeni dijalizom, senzibilizirani (89, 147). Prema literaturnim navodima i metaanalizama prisutnost vaskularnih kalcifikata u aorti i ilijakalnim arterijama u primatelja bubrega nije povezana s većom učestalošću DGF-a, ali je povezana s većim rizikom od gubitka transplantata u prvoj godini po transplantaciji i smrtnim ishodom primatelja (148, 149).

U ovoj disertaciji ispitivana je povezanost izraženosti BMP-2 i BMP-7 u vaskularnom tkivu primatelja i ranog transplantacijskog ishoda, u kojoj se po prvi put istovremeno analizira izražaj obaju BMP-ova u vaskulaturi primatelja bubrega. Kirurški principi transplantacijskog liječenja uključuju prepariranje ilijačnih krvnih žila primatelja za anastomoziranje krvnih žila transplantiranog organa te podvezivanje ogranaka, kao što je donja epigastrična arterija, ogranak vanjske ilijačne arterije (49). Uobičajeno odbačeni biološki materijal kod kirurškog transplantacijskog liječenja korišten je za analiziranje.

S obzirom na mali broj literaturnih navoda o izraženosti BMP-ova u vaskulaturi u humanoj populaciji, prvotno smo usporedili izraženost BMP-2 i BMP-7 u endotelu i VSMC-u u vaskulaturi ispitanika s urednom bubrežnom funkcijom (kontrolna skupina 16 ispitanika) i 79 ispitanika s KBB-om 5. stadija u trenutku transplantacijskog liječenja (ujednačenih po dobi,

spolu i učestalosti arterijske hipertenzije). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je izraženost obaju BMP-ova veća u ispitanika kontrolne skupine. Ovi rezultati posljedica su manje izraženosti BMP-2 u endotelu u ispitanika KBB-a 5. stadija u trenutku transplantacijskog liječenja nego u kontrolnoj skupini ispitanika uredne bubrežne funkcije, dok je izraženost BMP-7 i u endotelu i u VSMC-u podjednaka u objema skupinama. Istraživanje Oštrića i suradnika u manjoj kohorti ispitanika sa KBB u odnosu na našu kohortu pokazalo je veću izraženost obaju BMP-ova, u stijenci renalnih arterija 15 KBB bolesnika s vaskularnim kalcifikatima no u 10 ispitanika uredne bubrežne funkcije (140).

Izraženost BMP-2 i BMP-7 u ispitanika u našem istraživanju nije povezana sa spolom, dobi, osnovnom bubrežnom bolesti, tipom dijalize (HD, PD), pušenjem, HLP-om, BMI-jem, arterijskom hipertenzijom, kardiovaskularnim ili cerebrovaskularnim bolestima u anamnezi, ali je povezana s duljinom liječenja dijalizom. Dulje liječenje dijalizom povezano s manjom izraženosti BMP-2 i većom izraženosti BMP-7 i u endotelnim i u VSMC arterija.

Dobro je poznato da je od svih bolesnika koji bubrežnu funkciju nadomještaju dijalizom za transplantaciju podobno svega 25 – 30 % (nakon detaljne i opsežne predtransplantacijske obrade) (36). Iako su potencijalni primatelji bubrega „manje“ bolesni dijalizni bolesnici, i oni imaju velik aterosklerotski vaskularni pobol (127). Vaskularni kalcifikati, „miraz“ dijaliznog liječenja, ne regrediraju nakon transplantacijskog liječenja. Njihova progresija uglavnom usporava na stope uočene u bolesnika s urednom bubrežnom funkcijom, ali dulje trajanje završnog stadija KBB-a i dulje liječenje dijalizom povezani su s progresijom vaskularnih kalcifikacija nakon transplantacijskog liječenja (150).

I ispitanici u našem istraživanju imaju mnogobrojne rizike (72 % pušača, 86 % hipertoničara, 41 % HLP, 51 % preuhranjenih) za nastanak vaskularnih kalcifikacija; u njih 57 % radiološki su potvrđeni makrokalcifikati u vaskulaturi zdjelične regije, što je komplementarno dosadašnjim istraživanjima. Vaskularni kalcifikati gotovo su patognomonični za KBB; nastaju već u početnim stadijima KBB-a; ima ih 25 % bolesnika s KBB-om 3. stadija, 35 % s KBB-om 4. stadija i čak 50 do 79 % s KBB-om 5. stadija kada je potrebno nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom ili transplantacijom (151 – 153). Mikrocalcifikati potvrđeni Von Kossa bojenjem u mediji epigastrične arterije znatno su rjeđi od radiološki potvrđenih makrokalcifikata zdjeličnih arterija; ima ih svega 16,5 % ispitanika. Od 45 ispitanika s radiološki potvrđenim makrokalcifikatima zdjeličnih arterija u samo devet (20 %) potvrđeni su i mikrocalcifikati. Obratno, kod ispitanika s pozitivnim Von Kossa bojenjem za



mikrokalCIFikate 60 % (9 od 15) ima i radiološki potvrđene makrokalCIFikate. Ovu razliku možemo pripisati različitim dijagnostičkim metodama (pregled radiološke snimke, mikroskopski pregled krvne žile) i različitim promjerom krvnih žila (velike – ilijačne, male – epigastrične arterije). To što je donja epigastrična arterija ogranak vanjske ilijačne arterije ne znači da je njezin surogat, a osim toga, vaskularni kalCIFikati često su „raspršeni“, nisu kontinuirani, vidljiviji su na radiološkim snimkama kojima se analizira veći broj krvnih žila nego mikroskopskom analizom (nekoliko mikrometarskog) poprečnog presjeka krvne žile. Sukladno našim rezultatima Dai i suradnici u svojem istraživanju vaskularnih kalCIFikata u primatelja bubrega pokazali su da radiološki potvrđeni kalCIFikati u koronarnim arterijama nisu bili prediktivni za histološki Von Kossa bojenjem potvrđene vaskularne kalCIFikate epigastričnih arterija (154).

Aterosklerozu karakterizira nakupljanje ateromatoznih plakova prepunih lipida i kolesterola u intimalnom sloju arterija. Lipoproteini niske gustoće – LDL (engl. *low density lipoproteins*) talože se ispod endotela i oksidiraju, kemotaksijom pristigli monociti diferenciraju se u makrofage koji apsorbiraju oksidiranih LDL-a postaju pjenaste stanice, što rezultira stvaranjem masnih pruga. Cijeljenje upalnih promjena u intimi proliferacijom i migracijom VMSC-a iz medije u intimu završava fibrozom i kalCIFikacijom plaka (143).

BMP-2 potičući diferencijaciju VSMC-a u osteohondrogene stanice pridonosi kalCIFiciranju, a BMP-7 više ili manje uspješno onemogućava ili oslabljuje nastanak vaskularnih kalCIFikata (129, 155).

Laboratorijski nalazi hiperfosfatemije, povišenog PTH i niskih razina vitamina D u životinjskom modelu KBB-a praćeni su izraženom vaskularnom kalCIFikacijom, a imunohistokemijska analiza pokazala je povećanu ekspresiju BMP-2, RUNX2 i receptora vitamina D u stijenci aorte. Dvotjedno liječenje BMP-7 u životinjskom modelu KBB-a povezano je s laboratorijskim smanjenjem hiperfosfatemije i sniženjem PTH, a imunohistokemijska analiza aortalne stijenke pokazala je smanjenje izražaja BMP-2, RUNX2 i receptora vitamina D (156).

Poznato je da su BMP-2, BMP-4 i osteoblastni i osteoklastni regulacijski proteini osteopontin, osteonektin, OPG i RANKL različito izraženi u kalCIFiciranim aterosklerotskim plakovima. U *in vitro* potaknutom oksidativnom stresu BMP-2 pojačava izražaj glavnog transkripcijskog regulatora osteoblasta i hondrocita RUNX2 i potiče mineralizaciju u ljudskim koronarnim VSMC-ima (157).

Radiološki potvrđeni vaskularni kalcifikati u naših ispitanika povezani su s tradicionalnim čimbenicima rizika za njihov nastanak: starija dob, pušenje, HLP, ali i duljina liječenja dijalizom. Unatoč uobičajenom stajalištu da su tradicionalni čimbenici rizika za nastanak vaskularnih kalcifikata inferiorniji od laboratorijskih biomarkera, istraživanje Daija i suradnika pokazalo je da su kalcifikati epigastrične arterije u primatelja bubrega bolje povezani s tradicionalnim čimbenicima rizika nego s biomarkerima kao što su visokospecifični CRP, IL-6, RANKL i PTH (154 –ne mijenja se broj).

Hipotezu o većoj endotelnoj i VSMC izraženosti BMP-2 promotora vaskularnih kalcifikata u ispitanika s makrokalcifikatima nismo potvrdili; endotelna i VSMC izraženost podjednaka je u ispitanika sa i onih bez makrokalcifikata.

Rezultati istraživanja Petkovića i suradnika u bolesnika s KBB-om 5. stadija u trenutku započinjanja nadomještanja bubrežne funkcije HD-om na tragu su naših; u bolesnika s radiološki potvrđenim kalcifikatima ilijakalnih, femoralnih i radijalnih arterija nije nađeno veće izraženosti BMP-2 u stijenci radijalne arterije (158).

Obzirom na inhibicijsku ulogu BMP-7 u nastanku vaskularnih kalcifikata iznenađuje da u našem istraživanju statistički znatno veću endotelnu izraženost BMP-7 imaju ispitanici s radiološki potvrđenim vaskularnim kalcifikatima zdjelčnih arterija.

Mikrokalcifikati epigastrične arterije potvrđeni Von Kossa bojenjem nisu povezani s izraženošću BMP-2 i BMP-7 u endotelu i VSMC arterija.

Oportune uloge BMP-2 i BMP-7 u vaskularnoj patologiji potvrđene su i našim istraživanjem, ali rezultati pokazuju veću izraženost BMP-7, a ne BMP-2 u ispitanika s radiološki potvrđenim vaskularnim kalcifikatima i onih dulje liječenih dijalizom. Činjenica je da smo izraženost BMP-ova procjenjivali samo u epigastričnoj arteriji, a radiološki smo procijenili kalcifikate u epigastričnoj arteriji, ali i u svim ostalim zdjelčnim arterijama. Opsežnost vaskularnih kalcifikata očekivano je veća u radiološkoj nego u mikroskopskoj analizi jer je promatrano više arterija. Kalcifikacija prati upalu u humanoj aterosklerozi (143) i vjerojatno predstavlja sekundarni fenomen. Opsežnost kalcifikacije proporcionalna je težini prethodne upale i moguć je proces ozdravljenja – popravka stijenke krvne žile, ali sa razvojem stenozе lumena što rezultira patofiziologijom krvnog protoka i pogoršanjem tkivne i organske funkcionalnosti (159). U 57 % naših ispitanika s radiološki potvrđenim vaskularnim makrokalcifikatima radi se o završenom procesu, ali prisutnost makrokalcifikata ne isključuje proces nastanka novih. Veća izraženost BMP-7 može biti rezultat njegovog djelovanja u ranim fazama upale stijenke krvne žile, prijestvaranja vaskularnih kalcifikata. Infiltracija

monocita i njihova diferencijacija u makrofage jedan je od početnih koraka u nastanku vaskularnih kalcifikata. BMP-2 potiče diferenciranje kemotaksijom pristiglih monocita u ozljeđeni endotel u proupalne makrofage M1 (160). Proupalni makrofagi M1 prevladavajući su makrofagi u kalcificiranim aortalnim zaliscima. *In vitro*, VSMC ljudske aorte potaknute izvanstaničnim vezikulama sintetiziranih iz makrofaga M1 tretiranih uremičnim toksinima povećavaju svoj volumen i izražaj osteogenih markera mikroRNA-223-3p (koja regulira metabolizam minerala) i BMP-2 (161). BMP-7 za razliku od BMP-2 inhibira diferencijaciju monocita u proupalne M1, a potiče diferencijaciju u protuupalne makrofage M2 koji su vaskulo-protektivni u ranoj fazi aterosklerotske bolesti. Veća izraženost BMP-7 u endotelu epigastričnih arterija naših ispitanika sa makrokalcifikatima moguće je rezultat sprečavanja nastanka novih vaskularnih kalcifikata koji bi se tek trebali dogoditi u vaskularno bolesnijih primatelja bubrega, dulje liječenih dijalizom u kojih je očekivana veća progresija vaskularnih kalcifikata (127, 150).

Neželjeni je događaj u transplantacijskom liječenju DGF. Mnogobrojni su čimbenici koji utječu na ishod transplantacijskog liječenja: osobine darivatelja, kvaliteta i prezervacija eksplantiranog organa, vrijeme hladne ishemije, osobine primatelja, imunološka podudarnost darivatelja i primatelja i kirurgija transplantacije.

Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali statistički znatan utjecaj karakteristika darivatelja ni primatelja na DGF. Ispitanici s DGF-om češće su primali transplantirani bubreg od darivatelja po proširenim kriterijima, kao i od starijih darivatelja, darivatelja s većom učestalosti šećerne bolesti i/ili arterijske hipertenzije, a imali su i dulje vrijeme hladne ishemije. Međutim, nijedna od tih razlika nije dosegla statističku važnost.

Retrospektivno istraživanje Fellmana i suradnika u koje je uključeno 470 primatelja bubrega pokazalo je statistički znatno veću učestalost DGF-a u 42 % primatelja bubrega od darivatelja po proširenim kriterijima (162).

Vrijeme hladne ishemije relativno je kratko (13,4 sati) za cijelu kohortu u našem istraživanju i nije imalo utjecaj na DGF. Luo i suradnici u svojem retrospektivnom istraživanju u kojem je 14 % ispitanika imalo DGF pokazali su da je vrijeme hladne ishemije dulje od 16 sati imalo negativan učinak na rani transplantacijski ishod (163). Dulje vrijeme hladne ishemije povezano je s većom razinom markera stanične smrti – mitohondrijske DNA u urinu primatelja s DGF-om (164).

U našem su istraživanju muškarci s kroničnim glomerulonefritisom imali češće DGF, ali bez statističke važnosti. Literaturni navodi upućuju da duljina liječenja dijalizom (76), pretilost i šećerna bolest povećavaju rizik za DGF (165, 166). U našem je istraživanju 51 % ispitanika pretilo, duljina liječenja dijalizom relativno je kratka (prosječno dvije godine), samo je 4 % ispitanika sa šećernom bolesti, što umanjuje utjecaj ovih čimbenika na DGF. Manja imunološka podudarnost (osobito u lokusu HLA-DR) i senzibiliziranost primatelja čimbenici su rizika za DGF (147). Imunološka podudarnost za čitavu kohortu u našem je istraživanju povoljna, raspona 1 do 5, medijan 3, a samo su dva ispitanika senzibilizirana PRA-om 6 % i 12 %.

Za razliku od navedenih promjenjivih čimbenika rizika razvoja DGF-a, ishemijsko-reperfuzijska ozljeda nepromjenjiv je i neizbježan je događaj u svakoj transplantaciji bubrega. Njen intenzitet i trajanje utječu na pojavnost DGF-a iako ključni čimbenici koji pridonose intenzitetu ishemijske-reperfuzijske ozljede nisu sasvim jasni (167).

Procjena funkcije transplantiranog bubrega nakon transplantacijskog liječenja tradicionalno se temelji na kombinaciji kliničkih (izlučivanje mokraće), laboratorijskih (serumski kreatinin), imunoloških (DSA), instrumentalnih (CD-UZV i mjerenje indeksa otpora u vaskulaturi transplantata) i histoloških parametara (biopsija transplantata). Ako se funkcija transplantata ne uspostavi dulje od sedam dana nakon operativnog zahvata i nadomješta se dijalizom, govorimo o DGF-u. Zbog ograničenja i složenosti tradicionalnih biomarkera, tijekom posljednjeg desetljeća traže se i ispituju novi biomarkeri koji se mogu mjeriti u biološkim tekućinama, kao što su perfuzijska otopina, darivateljeva i/ili primateljeva krv ili urin (168). Prediktivni biomarkeri darivatelja koji najviše obećavaju povišene su razine mitohondrijske DNA u plazmi te povišene razine komponente komplementa C5a, MCP-1 i NGAL-a u urinu (67,167). Otpuštanje faktora inhibicije migracije makrofaga u primatelja tijekom kirurškog zahvata transplantacije bubrega igra važnu ulogu u zaštiti bubrega, stoga njegova razina može biti potencijalni biomarker za predviđanje rane funkcije transplantata; više intraoperativne plazmatske razine povezane su s IGF-om, a niže s DGF-om (169).

Endotrofin (specifični fragment pro-kolagena tipa VI) potiče upalni odgovor kod bolesti bubrega, a njegova povišena predtransplantacijska razina u plazmi primatelja povezana je s većim rizikom za DGF (170), kao i povišene plazmatske razine NGAL-a, laktat dehidrogenaze te povišene urinske razine NGAL-a, MCP-1, IL-18, mikro-RNA bez stanica (167, 171 – 173). Unatoč istraživanjima o mnogobrojnim DGF prediktivnim biomarkerima, do

danas nijedan nije dovoljno validiran niti preporučen i odobren kao dijagnostički laboratorijski test (167).

U potrazi za validnim DGFprediktivnim markerom, izraženost BMP-2 i BMP-7 u endotelnim i VSMC primatelja čini se kao zanimljiva mogućnost za procjenu posttransplantacijskog ishoda. U našem istraživanju neželjeni događaj u transplantacijskom liječenju – DGF imalo je 19 % ispitanika, što je komplementarno učestalosti u brojnim objavljenim istraživanjima (68 – 70). Nije bilo znatnih razlika u općim karakteristikama darivatelja i ispitanika s IGF-om i DGF-om kao što su spol, dob, duljina liječenja dijalizom i osnovna bubrežna bolest. Radiološki potvrđeni kalcifikati krvnih žila zdjelice, kao ni mikrokalifikati potvrđeni Von Kossa bojenjem nisu povezani s DGF-om ni s IGF-om, sukladno literaturnim navodima (148, 149).

Iako istraživanja nisu potvrdila da je aterosklerotska kalcificirajuća vaskularna bolest u primatelja bubrega povezana s lošijim ranim nego kasnim transplantacijskim ishodima, hipotezu veće izraženosti BMP-2 i manje izraženosti BMP-7 u DGF temeljimo na njihovim različitim učincima u endotelnoj i VMSC disfunkciji dugotrajnog oksidativnog stresa u KBB-u i nastanku vaskularnih kalcifikata (174): vaskulo-osteo-induktivnoj aktivnosti BMP-2 i vaskulo-osteo-inhibitornoj aktivnosti BMP-7.

Naši rezultati pokazuju da veća izraženost BMP-2 u endotelnim stanicama epigastričnih arterija nije povezana sa DGF nego sa IGF. Ispitanici koji nemaju endotelnu izraženost BMP-2 gotovo u pravilu imaju DGF. Veća endotelna izraženost BMP-2 najjači je prediktor IGF i to je statistički važno i nakon prilagodbe za dob, spol, BMI, pušenje i anamnezu arterijske hipertenzije, šećerne bolesti, kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti (za ispitanike i darivatelje), duljinu liječenja dijalizom, vrijeme hladne ishemije i MM. Za razliku od BMP-2, izraženosti BMP-7 u endotelnim i u VSMC epigastričnih arterija nije se razlikovala u ispitanika s DGF-om i onih s IGF-om. Nije jednostavno obrazložiti naše rezultate jer se pregledom literature ne nalazi istraživanja u dostatno sličnim uvjetima i glavnim ishodom istraživanja. Dosadašnja istraživanja upućuju na povezanost histološke-vaskularne izraženosti i plazmatskih razina BMP-ova koje u našem istraživanju nismo određivali. Većina je ovih istraživanja provedena u bolesnika s kardiovaskularnom patologijom (ishemijske bolesti miokarda zbog stenoza i tromboza koronarnih arterija) a znatno manje u KBB-bolesnika. Više plazmatske razine BMP-2, a niže BMP-7 zabilježene su u KBB-bolesnika u usporedbi s ispitanicima uredne bubrežne funkcije; vrijednosti sistoličkog i dijastoličkog arterijskog tlaka

pozitivno su korelirale s omjerom BMP-2/BMP-7 u plazmi (175). Studija Dafina i suradnika pokazala je značajno više plazmatske razine BMP-2 u bolesnika s KBB u usporedbi sa zdravim ispitanicima; razina BMP-2 bila je obrnuto proporcionalna s GFR (144). Oksidativni stres proporcionalan je sa stupnjem KBB-a, a dodatno ga pogoršava nadomještanje bubrežne funkcije HD-om. Istraživanje Valtuillea i suradnika u koje je uključeno 129 HD-bolesnika pokazalo je da čak 67 % bolesnika ima povećan indeks oksidativnog stresa kao rezultat neuravnoteženih peroksidacijskih i antioksidacijskih procesa. Veći indeks oksidativnog stresa povezan je s nižim hemoglobinom i većom mjesečnom dozom željeza, ali i dijaliznim centralnim venskim kateterom kao vaskularnim pristupom za provođenje HD-a (176). U istraživanju Coste i suradnika 49 HD-bolesnika imalo je veće plazmatske razine BMP-2 od kontrolne skupine uredne bubrežne funkcije (24 ispitanika). Zanimljivo, HD-bolesnici s centralnim venskim kateterom kao vaskularnim pristupom imali su znatno više razine BMP-2, IL-6, CRP-a te niži hemoglobin, hematokrit i hepcidin od HD-bolesnika s AVF-om. Utvrđene su negativne korelacije između plazmatske razine BMP-2 i broja eritrocita i retikulocita; izgledno je da je anemijom uzrokovana hipoksija patofiziološka podloga viših plazmatskih razina BMP-2 (177).

Zabilježen je i znatan porast plazmatske razine BMP-2 (i RANKL) 24 sata nakon kardiokirurškog liječenja bolesti srčanih zalistaka, a korelirao je s GFR-om; plazmatska varijabilnost BMP-2 (i RANKL-a) moguće je povezana s ishemijsko-hipoksijskom ozljedom koja je karakteristična za kardiovaskularne bolesti, ali i KBB (178). OPG inhibicija signalizacije RANKL/RANK ima antiaterosklerotski učinak koji je suprotstavljen proaterosklerotskom učinku signalizacijom NF $\kappa$ B/RANKL/RANK/BMP-2. Omjer RANKL/OPG smatra se plazmatskim biljegom koji dobro korelira sa stupnjem kalcifikacije (koronarnih) arterija (179). PTH (marker koštane pregradnje i patološkog mineralno koštanog metabolizma u KBB-u) povisuje ekspresiju RANKL-a te snižava izražaj OPG-a, dovodeći do kataboličkog/osteoklastičnog učinka. Kompleksnost patofizioloških događanja u KBB-u zasigurno utječe na odstupanja od očekivanih dobro dokumentiranih molekularnih/staničnih obrazaca što pokazuju i naši rezultati. Istraživanje Lončarića i Čelića pokazalo je da HD-bolesnici s izrazito povišenim PTH-om imaju očekivano izrazito povišen plazmatski omjer RANKL/OPG, dok oni s umjereno povišenim PTH-om neočekivano imaju niži plazmatski omjer RANKL/OPG od onih s urednim vrijednostima PTH (180).

Povišene plazmatske razine BMP-2 osim u kroničnim ishemijskim bolestima zabilježene su i u akutnim ishemijskim bolestima kada liječenje dovodi do reperfuzije i dobrih kliničkih ishoda. U istraživanju Kercheva i suradnika povišena plazmatska razina BMP-2 24 sata nakon infarkta miokarda bila je povezana s boljom (sistoličkom) funkcijom srca u šestomjesečnom praćenju (181). U mišjem modelu akutnog infarkta miokarda egzogena primjena BMP-2 smanjila je apoptozu kardiomiocita, opsežnost nekroze miokarda i na makrorazini veličinu infarkta. *In vitro* BMP-2 smanjio je apoptozu kardiomiocita (potičući fosforilaciju proteina SMAD 1/5/8) i zaštitio kardiomiocite od dugotrajnog staničnog oštećenja izazvanog hipoksijom i oksidativnim stresom (182). Ako ove dobre učinke BMP-2 u kardiološkim ishemijsko-reperfuzijskim stanjima primijenimo u transplantaciju bubrega, moguće je da endogeni BMP-2 može ublažiti ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu i spriječiti nastanak DGF-a. Veća endotelna izraženost BMP-2 u našem istraživanju povezana je s dobrim ranim posttransplantacijskim ishodom, IGF-om.

Suprotno od povišenih plazmatskih razina BMP-2 u ishemijskim kardiovaskularnim bolestima i KBB-u, razine BMP-7 smanjene su u eksperimentalnim modelima KBB-a i u bolesnika s KBB-om različite etiologije; dijabetičkoj i hipertenzivnoj nefropatiji, kroničnim tubulointesticijskim nefritisima, opstruktivnoj uronefropatiji (143, 175). Osim u KBB-u plazmatska razina BMP-7 smanjena je i u bolesnika s akutnom bubrežnom bolesti. Unatoč preventivnim mjerama, akutna nefropatija uzrokovana intravenskom primjenom kontrasta u radiološko-intervencijskim pretragama kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih i malignih bolesnika vrlo je učestala. Duranay i suradnici u svojem istraživanju procijenili su plazmatsku razinu BMP-7 prije i 48 sati nakon koronarografije. Plazmatske razine BMP-7 ostale su nepromijenjene u bolesnika koji nisu razvili kontrastom uzrokovanu akutnu nefropatiju, a značano su se smanjile u onih sa akutnom nefropatijom (183). U mišjem modelu ishemijsko-reperfuzijske ozljede bubrega egzogena primjena BMP-7 inhibirala je izlučivanje proinflammatornih kemokina (IL-1 i TNF- $\alpha$ ) iz tubularnih epitelnih stanica. Ovim djelovanjem smanjena je apoptoza, ali i neželjena epitelno-mezenhimska tranzicija tubularnog epitela koja dovodi do fibroznih promjena i gubitka funkcije (118).

Izraženost BMP-2 i BMP-7 različita je u transplantatima nakon eksplantacije zbog afunkcije/malfunkcije. Velika izraženost BMP-2 nađena je u tubularnim epitelnim stanicama eksplantiranih bubrega neovisno o stupnju intersticijske fibroze i tubularne atrofije. Izraženost BMP-7 povećana je u transplantatima bez intersticijske fibroze i tubularne atrofije, a smanjena

u transplantatima s uznapredovalom intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom. Indikacije su za rano uklanjanje transplantata infekcija primatelja koja zahtijeva prekidanje imunosupresivnog liječenja, tromboza bubrežne vene ili arterije i kirurške komplikacije. Najčešća je indikacija za kasno uklanjanje transplantata kronična disfunkcija presatka. Zanimljivo, veća je izraženost BMP-7 u transplantatima uklonjenima u prva tri mjeseca nakon transplantacije u odnosu na transplantate uklonjene nakon dvanaest mjeseci od transplantacije. Na izraženost BMP-2 nije utjecalo vrijeme od transplantacije do eksplantacije (184). Znatno različite, aktivnosti BMP-2 i BMP-7 u nastanku vaskularnih kalcifikata (BMP-2 promotor, BMP-7 inhibitor) i nefroprotekciji (BMP-7) ne prate tako različite aktivnosti u ishemijsko-reperfuzijskim stanjima. U našem istraživanju endotelna izraženost BMP-7 nije povezana s ranim posttransplantacijskim ishodom, podjednaka je u ispitanika s DGF i IGF, dok je manja endotelna izraženost BMP-2 povezana s DGF, a veća s IGF.

Iako su nam mnogobrojna *in vitro* istraživanja na kulturama stanica tijekom proteklih dvadesetak godina približila sintezu BMP-2 i BMP-7 (i ostalih članova nadobitelji TGF- $\beta$ ), afinitete i kinetiku vezanja za receptore tipa I i II, redosljed stvaranja i geometriju kompleksa BMP-receptor, unutarstaničnu SMAD i ne-SMAD-signalizaciju i poruku/e koju određeni BMP šalje stanici što treba napraviti, ove spoznaje nije jednostavno implementirati u humanu fiziologiju, a osobito patofiziologiju, što pokazuju i naši rezultati.

Štoviše, novija istraživanja pokazuju da neke ranije pretpostavke o djelovanju BMP-2 i BMP-7 nisu potpuno točne. Mnogo je nedoumica, na mnogobrojna pitanja traže se odgovori.

Jedna je od nedoumica aktivnost BMP-ova u homodimernim i heterodimernim oblicima. Istraživanja pokazuju da se BMP-ovi mogu heterodimerizirati kada su prekomjerno izraženi. U *in vitro*, ali i u *in vivo* istraživanjima heterodimeri pokazuju jaču aktivnost od homodimera; heterodimeri BMP-2/BMP-7 ili BMP-4/BMP-7 znatno su potentniji od bilo kojeg homodimera u testovima osteogene diferencijacije (185).

Istraživanje Kima i suradnika pokazuje da BMP-7 djeluje uglavnom kao heterodimer s BMP-2 ili BMP-4 tijekom embriogeneze sisavaca. Funkcionalna važnost heterodimera u odnosu na homodimere varijabilna je u različitim tkivima i u različitim fazama embriogeneze. Izgledno je da heterodimeri imaju aktivnosti koje ne mogu ostvariti homodimeri (186). Brojne fiziološke promjene embrionalnog razvoja posredovane BMP-ovima dokumentirana su i u odraslim organizmima kod popravka uslijed ozljeda stanica, tkiva i organa, stoga je logično zaključiti da se djelovanja BMP-ova posredovana heterodimerima događaju i u odraslim organizmima. Nameće se pitanje djelovanje kojeg BMP-a u heterodimernim oblicima BMP-



2/BMP 7 prevladava; izvjesno je sinergijsko djelovanje u smanjenju ishemijskih ozljeda, a upitno njihovo djelovanje u aterogenezi i kalcifikaciji vaskulature u kojima ova dva BMP-a imaju oprečna djelovanja.

BMP-ovi svoja djelovanja ostvaruju vezanjem na receptore na staničnim membranama.

Izraženost, ali i funkcionalnost BMP-receptora tipa I i tipa II ovisna je o tipu stanica i tkiva, ali i o fiziološkim ili patofiziološkim procesima. O kompleksnosti signalizacije BMP svjedoče mnogobrojni literaturni navodi. BMP-2 veže se za receptore tipa I ALK3 s 50 do 60 puta većim afinitetom od receptora tipa II. *In vitro* analize interakcija (korištenjem površinske plazmonske rezonancije) pokazale su da se BMP-2 većim afinitetom veže za ActRIIB nego za druge receptore tipa II, iako su razlike među tri receptora tipa II vrlo male. Teško je razumjeti da sklop ligand-receptor koji se sastoji od BMP-2, ALK3 i ActRIIB ne tvori aktivni signalni kompleks, dok sklop ligand-receptor u kojem je ActRIIB zamijenjen s BMPRII ili ActRII to može učiniti. Osobito ako se zna da sva tri receptora tipa II za koje se veže BMP-2 imaju 65 % identičnosti aminokiselinskog slijeda te da među kompleksima BMP-2/ALK3/ActRIIB i BMP-2/ALK3/ActRII nema nikakvih strukturnih razlika koje mogu objasniti različitu aktivaciju receptora (187).

Ipak, Liu i suradnici pokazali su da u staničnoj liniji prekursora osteoblasta BMP-2 može potaknuti signalizaciju SMAD i izražaj alkalne fosfataze putem ActRIIB, što pokazuje da funkcionalnost ActRIIB-a ovisi o tipu stanice na kojoj je izražen (188).

Važna je činjenica da su receptori tipa I i tipa II „promiskuitetni“ i dopuštaju vezanje i drugih članova nadobitelji TGF- $\beta$ . Aktivin A veže ActRII s puno većim afinitetom od BMP-2; kao posljedica toga, kod istovremene prisutnosti, aktivin A (unutarstanična signalizacija SMAD 2/3) djelovat će kao kompetitivni antagonist BMP-2 onemogućavajući BMP unutarstaničnu signalizaciju SMAD 1/5/8. Ovakve antagonističke aktivnosti aktivina A i BMP-2 pokazane su u različitim biološkim procesima kao što su osteogeneza i biologija tumora (187).

BMP-7 se sidri za staničnu membranu interakcijom s njihovim receptorima tipa II, potom ovi kompleksi regrutiraju receptor tipa I ALK2, ALK3 i ALK6 za pokretanje signalizacije. Afinitet BMP-7 za ALK3 i ALK6 trideset je puta veći od afiniteta za ALK2, iako su kemijsko umrežavanje i stanični testovi identificirali ALK2 kao najdjelotvorniji receptor tipa I za BMP-7-posredovanu signalizaciju (189).

BMP-7 izazvana diferencijacija monocita u protuupalne makrofage M2 (koja se događa u ranoj fazi aterogeneze) posredovana je receptorima tipa II ActRII i BMPRII, ali ne i ActRIIB i posljedica je nekanonske, SMAD-neovisne signalizacije (190).

Očito je redosljed regrutiranja receptora BMP-7 (receptor tipa II, potom receptor tipa I) obrnut je od BMP-2 (receptor tipa I, potom receptor tipa II) što osim kvantitativnih dovodi i do kvalitativnih razlika u signalizaciji. Dodatne strukture stanične površine kao što su koreceptori ili komponente izvanstaničnog matriksa (npr. proteoglikani) mogu sudjelovati u ovoj interakciji i onemogućavati vezanje BMP-ova za receptore, unatoč njihovoj sintezi (187).

U našem istraživanju izraženosti BMP-ova u VSMC-u u sjeni su endotelnih izraženosti, odnosno neizraženosti, osobito BMP-2. BMP-2 manje je izražen kod ispitanika nego u kontrolnoj skupini, manje je izražen kod ispitanika dulje liječenih dijalizom i manje je izražen kod ispitanika koji nakon transplantacije imaju DGF. Za razliku od BMP-2, BMP-7 u endotelu (ali i u VSMC-u) jače je izražen u ispitanika dulje liječenih dijalizom, u ispitanika s vaskularnim kalcifikacijama, ali izraženost BMP 7 nije povezana s DGF-om. Složenost i brojnost patofizioloških događanja u KBB-u (endogeni čimbenici), osobito u KBB bolesnika koji nadomještaju bubrežnu funkciju dijalizom (egzogeni čimbenici) utječu na signalizaciju BMP i aktivnosti, a time i na vaskularnu izraženost BMP-2/BMP-7. Uz promiskuitet receptora tipa I i tipa II za BMP-2 i BMP-7 dokazan u brojnim *in vitro* istraživanjima izgledno je da uremijski toksini oksidativnim stresom, hipoksijom i ozljedom endotela mijenjaju njihovu signalizaciju i učinke *in vivo* što pokazuju i rezultati našeg istraživanja. Buduća istraživanja nužna su da spoznaje iz dosadašnjih *in vitro* i *in vivo* istraživanja potvrdimo, proširimo i razumijemo u multimorbidnih bolesnika kakvi su KBB bolesnici 5. stadija – primatelji bubrega, u kojih se isprepliću, pojačavaju ili poništavaju razni molekularni događaji koji utječu na kliničke ishode. Naši rezultati upućuju da je neizraženost BMP-2 prediktor DGF, a izraženost prediktor IGF. Za rasvjetljavanje ovih neočekivanih rezultata u planiranju budućih istraživanja bilo bi poželjno primijeniti jednostavniji (životinjski) model DGF/IGF ali i provesti istraživanja u dostatno sličnim uvjetima u većim kohortama primatelja bubrega. Primjena osjetljivijeg indirektnog imunohistokemijskog bojenja primarnim i sekundarnim protutijelima može pridonijeti preciznijoj procjeni izraženosti BMP-ova u vaskularnoj stijenci. Nemamo odgovor na pitanje da li bi izraženosti BMP-2 i BMP-7 u vaskularnoj stijenci pratile plazmatske razine jer ih nismo određivali, što je jedno od ograničenja našeg istraživanja. Određivanje plazmatskih razina BMP-2 i BMP-7 neposredno prije transplantacijskog postupka, nakon stvaranja vaskularnih anastomoza te prvih 7 dana nakon transplantacije ali i istraživanje izraženosti ova dva morfogenetska proteina u bioptičkim uzorcima transplantata sa IGF i DGF pridonijelo bi razumijevanju utjecaja ovih molekula na ranu funkciju

transplantata. Izvjestan je nastavak istraživanja sinteze, signalizacije i aktivnosti BMP-ova u humanoj patofiziologiji.

## **6. ZAKLJUČAK**

Veća izraženost BMP-2 u endotelnim stanicama arterija najjači je prediktor IGF-a, a ne DGF-a, što je suprotno postavljenoj hipotezi. Ispitanici koji nisu imali endotelnu izraženost BMP-2 gotovo su u pravilu imali DGF, a ispitanici s većom endotelnom izraženošću BMP-2 imali su manje izgleda za DGF i to je ostalo statistički važno i nakon prilagodbe za dob, spol, BMI, pušenje i anamnezu arterijske hipertenzije, šećerne bolesti, kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti (za ispitanike i darivatelje), duljinu liječenja dijalizom, vrijeme hladne ishemije, MM. Za razliku od BMP-2, izraženosti BMP-7 u endotelnim i u VSMC epigastričnih arterija nije se razlikovala u ispitanika s DGF-om i onih s IGF-om.

Rezultati našeg istraživanja nisu potvrdili ni hipotezu o većoj endotelnoj i VSMC izraženosti BMP-2 promotora vaskularnih kalcifikata u ispitanika s makrokalcifikatima. Izraženost BMP-2 u endotelu i VSMC-u epigastrične arterije nije se razlikovala u ispitanika s radiološki potvrđenim vaskularnim kalcifikatima ili bez njih. Izraženost BMP-7 u endotelu statistički je znatno veća u ispitanika s radiološki potvrđenim vaskularnim kalcifikatima. Mikrocalcifikati potvrđeni Von Kossa bojenjem nisu povezani s izraženošću BMP-2 i BMP-7 u endotelnim i VSMC arterija.

Izraženosti BMP-ova u VSMC-u u sjeni su endotelnih izraženosti, odnosno neizraženosti, osobito BMP-2. BMP-2 manje je izražen kod ispitanika – primatelja bubrega nego u kontrolnoj skupini uredne bubrežne funkcije, manje je izražen kod ispitanika dulje liječenih dijalizom i manje je izražen kod ispitanika koji nakon transplantacije imaju DGF. Suprotno od BMP-2, BMP-7 u endotelu (ali i u VSMC-u) jače je izražen u ispitanika dulje liječenih dijalizom, u ispitanika s vaskularnim kalcifikacijama, ali izraženost BMP 7 nije povezana s DGF-om.

Za rasvjetljavanje neočekivanih rezultata našeg istraživanja u planiranju budućih bilo bi poželjno:

- primijeniti jednostavniji (životinjski) model DGF/IGF
- primijeniti osjetljivije indirektno imunohistokemijsko bojenje primarnim i sekundarnim protutijelima
- odrediti plazmatske koncentracije BMP-2/BMP-7 neposredno prije transplantacijskog liječenja nakon stvaranja vaskularnih anastomoza te prvih sedam dana nakon transplantacije.

Rezultati našeg istraživanja upućuju da bi BMP-2 mogao biti obećavajući prediktivni biomarker DGF-a.



## 7. LITERATURA

1. Hall JE. Urinae Formation by Kidneys. U: Hall JE. Guytonand Hall. Text book of Medical Physiology. 12. izdanje. Phyladelphia: Saunders Elsevier; 2011. str. 303.
2. Rayner HC. Kidney anatomy and physiollgy.U: Rayner HC, Milford DV, Thomas M. Understanding Kidney Diseases. Prvo izdanje. Švicarska: Springer International; 2016. str.1-10.
3. Bailey MA, Unwin RJ. Renal Physiology. U: Feehally J, Floege J, Tonelli M, Johnson RJ. Comprehensive Clinical Nephrology. Šesto izdanje. London: Elsevier Inc; 2019. str.14.
4. Levin A, Stevens PE, Bilous RW, Coresh J, De Francisco ALM, De Jong PE et al. Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) CKD workgroup. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *KidneyIntSuppl.* 2013;3:1-150.
5. Stevens LA, Schmid CH, Greene T,Zhang YL, Beck GJ, Marc Froissart M et al. Comparative performance of CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 ml/min/ 1.73 m<sup>2</sup>. *Am J KidneyDis* 2010;56:486-95.
6. Levey A, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet* 2012;379:165-80
7. Goddard J, Turner AN.Kidney and urinary tract disease. U:Walker BR, Colledge NR, Ralston SH, Penman ID. Davidson's principles and practice of medicine. London, Churchill Livingstone; 2014. str. 461-524.
8. Rumbolt Zvonko. Metabolizam vode, elektrolita, minerala i acido - bazni poremećaji. U: Ivančević Ž. MSD Priručnik dijagnostike i terapije. Split: Placebo; 2000. str. 128-172.
9. KDIGO 2017 Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) *Kidney International Supplements* 2017;7(1):1-59.

10. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:1-266.
11. Van der Velde M, Matsushita K, Coresh J Astor BC, Woodward M, Andrew Levey A et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1341-52.
12. Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Andrew S Levey AS et al. Lower estimated GF and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta analysis of general and high risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;80:93-104.
13. Levey AS, DeJong PE, Coresh J. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies report. *Kidney Int* 2011;80:17-28.
14. Juričić P. Značaj mjerenja glomerularne filtracije u nefrologiji i kardiologiji. *Medicina fluminensis* 2012;48:151-63.
15. Bugnicourt JM, Godefroy O, Chillon JM, Choukroun G, Massy ZA. Cognitive disorders and dementia in CKD: the neglected kidney-brain axis. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:353-63.
16. Kuo CC, Kuo HW, Lee IM, Lee CT, Yang CY. The risk of upper gastrointestinal bleeding in patients treated with hemodialysis: a population-based cohort study. *BMC Nephrology* 2013;14:15-29.
17. Benjamin B, Yan X, Tingting L, Ali H M, Hong X, Yan Y et al. Changes in the US Burden of Chronic Kidney Disease From 2002 to 2016 An Analysis of the Global Burden of Disease Study. *JAMA Network Open*. 2018;1(7):e184412.
18. Provenzano M, Coppolino G, Faga T, Garofalo C, Serra R, Andreucci M. Epidemiology of cardiovascular risk in chronic kidney disease patients: there al silent killer. *Rev Cardiovasc Med*. 2019;20(4):209-20.

19. Agrawal V, Jaar BG, Frisby XY, Chen SC, Qiu Y, Li S et al. Access to health care among adults evaluated for CKD: findings from the kidney early evaluation program (KEEP) *Am J Kidney Dis* 2012;59:5–15.
20. Tattersall J, Dekker F, Heimbürger O, Jager KJ, Lameire N, Lindley E et al. ERBP Advisory Bord. When to start dialysis: up dated guidance following publication of the Initiating Dialysis Early and Late (IDEAL) study. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26:2082-6.
21. Bleyer A. Indications for initiation of dialysis in chronic kidney disease. Up To Date. 2019. <http://www.uptodate.com>
22. Kes P, Bašić-Jukić N. Liječenje bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. *Interna medicina*. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. str.1091-97.
23. Daugirdas JT, Blake PG, Ing TS. *Handbook of Dialysis*. Fifth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015. <https://hsrc.himmelfarb.gwu.edu/books/23>.
24. Bašić Jukić N. Osnovni principi hemodijalize. U: Bašić Jukić N. *Hemodijaliza*. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 36-44.
25. Misra M. The basics of hemodialysis equipment. *Hemodial Int* 2005;9:30-6.
26. Hudolin T. Krvožilni pristup. U: Bašić Jukić N. *Hemodijaliza*. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str.109-119.
27. Kes P. Hemodijaliza: prošlost i sadašnjost. *Medicus*. 2001;10(1):269-82.
28. Ronco C, Ghezzi PM, LaGreca G. The role of technology in hemodialysis. *J Nephrol*. 1999;12:68-81.
29. Murdeshwar HN, Fatima Anjum F. Hemodialysis. *StatPearls* [Internet]; 2022. PMID: 33085443. Bookshelf ID: NBK563296 str.16
30. Knežević N, Kaštelan Ž, Bačak Kocman I. Pristup peritonealnoj šupljini. U: Bašić Jukić N, Rački S. *Peritonealna dijaliza* Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 19-29.



31. Rašić S, Bašić-Jukić N. Modaliteti peritonealne dijalize. U: Bašić Jukić N, Rački S. Peritonealna dijaliza Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 45-57.
32. Heimbürger O. Peritoneal physiology. In: Pereira BJG, Sayegh MH, Blake P. Chronic kidney disease, dialysis and transplantation: a companion to Brenner and Rector's the Kidney. Second Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005, str. 491-513.
33. Blake PG, Daugirdas JT. Physiology of peritoneal dialysis. U: Daugirdas JT, Blake PG, Todd SI, Handbook of Dialysis. Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott, Williams&Wilkins; 2007, str. 323-39.
34. Witowski J, Jörres A. Peritoneal dialysis: a biological membrane with a nonbiological fluid. In: Ronco C, Crepaldi C, Cruz DN. Peritoneal dialysis – from basic concepts to clinical excellence. Basel: Karger;2009, str. 27-34.
35. Živčić-Ćosić S, Colić M, Katalinić S, Devčić B. Peritonejska dijaliza. Medicina Fluminensis 2010;46:498-507.
36. Bašić Jukić N. Primatelj bubrega.U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. Transplantacija bubrega. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str.103-15.
37. Kramer A, Boenink R, Noordzij M, Bosdriesz JR, Stel VS, Beltrán P et al. The ERA-EDTA Registry Annual Report 2017: a summary. Clin Kidney J. 2020;13(4):693-709.
38. Gulin M, Slaviček J, Bašić-Jukić N, Kes P, Puretić Z, Bubić Filipi Lj. Outcome of renal transplantation in patients with chronic virus hepatitis. Acta Medica Croatica 2011;65: 315-21.
39. Ronald ME, Stock PG. Solid organ transplantation is a reality for patients with HIV infection. Curr HIV/AIDS Rep. 2006;3:132-38.
40. Nacionalne smjernice za obradu i procjenu primatelja i darivatelja bubrega usklađene sa smjericama 2013. European Renal Best Practice (ERBP) guideline on the management and evaluation of the kidney donor and recipient - 2. izdanje 2016. Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske. Dostupno na: <https://zdravlje.gov.hr>.
41. Rosengard BR, Feng S, Alfrey EJ, Zaroff JG, Emond JC, Henry ML et al. Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor. Am J Transplant. 2002;2:701-11.

42. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of the kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9:1-155.
43. Hofer J, Regele H, Bohmig GA, Gutjahr G, Kikić Z, Muhlbacher F et al. Pre-implantant biopsy predicts outcome of single-kidney transplantation independent of clinical donor variables. *Transplantation.* 2014;97:426-32.
44. Žunec R. Imunobiologija transplantacije. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. *Transplantacija bubrega.* Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str. 21-34.
45. Xiao Q, Fu B, Song K, Chen S, Li J, Xiao J. Comparison of Surgical Techniques in Living Donor Nephrectomy: A Systematic Review and Bayesian Network Meta-Analysis. *Ann Transplan.* 2020;25:e926677.
46. Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Chudoba P, Hałoń A, Mazanowska O, Gomółkiewicz A et al. The influence of warm ischemia elimination on kidney injury during transplantation – clinical and molecular study. *Sci Rep.* 2016;6:36118.
47. Heylen L, Naesens M, Jochmans I, Monbaliu D, Lerut E, Claes K et al. The Effect of Anastomosis Time on Outcome in Recipients of Kidneys Donated After Brain Death: A Cohort Study. *Am J Transplant.* 2015;15:2900-7.
48. Klaus F, Castro DB, Bittar CM, Bittar AE, Keitel E, Seelig DC et al. Kidney Transplantation with Belzer or Custodiol Solution: A Randomized Prospective Study. *Transplant Proc.* 2007;39:353-54.
49. Pasini J. Kirurški principi transplantacije bubrega. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. *Transplantacija bubrega.* Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str. 116-131.
50. Tavakoli A, Surange RS, Pearson RC, Parrott NR, Augustine T, Riad HN. Impact of Stents on Urological Complications and Health Care Expenditure in Renal Transplant Recipients: Results of a Prospective, Randomized Clinical Trial. *J Urol.* 2007;177:2260-64.
51. Zheng H, Jin B, Henrickson SE, Perelson AS, Von Andrian UH, Chakraborty AK. How antigen quantity and quality determine T-cell decisions in lymphoid tissue. *Mol Cell Biol.* 2008;28:4040-51.

52. Brunetta-Gavranić B, Bašić Jukić N. Akutna disfunkcija presatka. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. Transplantacija bubrega. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str. 222-45.
53. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med.* 2010 ;363:1451-62.
54. Krensky AM ,Vincenti F, Bennett WM. Immunosuppressants, tolerogens and immunostimulants. U: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* New York: McGraw-Hill; 2005. str. 1406-15.
55. Bašić-Jukić N, Likić R. Imunosupresivni lijekovi. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. Transplantacija bubrega. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str.144-74.
56. Nguyen LS, Vautier M, Allenbach Y, Zahr N, Benveniste O, Funck-Brentano C et al. Sirolimus and mTOR Inhibitors: A Review of Side Effects and Specific Management in Solid Organ Transplantation. *Drug Saf.* 2019;42:813-25.
57. Lake DF, Briggs AD. Immunopharmacology. U: Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology.* New York McGraw-Hill, 2017. str. 985-89.
58. Brown ED, Chen MYM, Wolfman NT, Ott DJ, Watson NE. Complications of renal transplantation: Evaluation with US and radionuclide imaging. *Radiographics.* 2000;20:607-22.
59. Kaštelan Ž, Hudolin T. Kirurške komplikacije nakon transplantacije bubrega.U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. Transplantacija bubrega. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str.175-82.
60. Orlić P, Vukas D, Dreščik I, Ivančić A, Blečić G, Budiselić B et al. Vascular complications after 725 kidney transplantations during 3 decades. *Transplant Proc.* 2003;35:1381-4.
61. Neri F, Tsivian M, Coccolini F, Bertelli R, Cavallari G, Nardo B et al. Urological complications after kidney transplantation: Experience of more than 1000 transplantations. *Transplant Proc.* 2009;41:1224-6.
62. Loupy A, Mengel M, Mark HaasM. Thirty years of the international Banff Classification for allograft pathology: The past, present, and future of kidney transplant diagnostics. *Kidney Int.* 2022;101(4):678-91.

63. Rašić S, Budimir A. Infekcije u primatelja transplantiranog bubrega. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. Transplantacija bubrega. Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str. 274-305.
64. Gulin M, Čivljak R, Bilić B, Sušić E, Gulin M. Infections during the first post transplant year-experience at Sibenik General Hospital. *Acta Med Croatica*. 2014;68:121-7.
65. Kramer A, Boenink R, Noordzij M, Bosdriesz JR, Stel VS, Beltrán P et al. The ERA-EDTA Registry Annual Report 2017: a summary. *Clin Kidney J*. 2020;13(4):693-709.
66. Siedlecki A, Irish W, Brennan D. Delayed Graft Function in the Kidney Transplant. *Am J Transplant*. 2011;11:2279-96.
67. Mannon R.B. Delayed Graft Function: The AKI of Kidney Transplantation. *Nephron*. 2018;140:94-8.
68. Xue W, Wang C, Chen J, Sun X, Wu X, Peng L. A prediction model of delayed graft function in deceased donor for renal transplant: a multi-center study from China. *Ren Fail*. 2021;43:520-9.
69. Kers J, Peters-Sengers H, Heemskerk MBA, Berger SP, Betjes MGH, van Zuilen AD et al. Prediction models for delayed graft function: external validation on The Dutch Prospective Renal Transplantation Registry. *Nephrol Dial Transplant*. 2020;35:1277.
70. Helanterä I, Hassan N, Ibrahim HN, Lempinen M, Finne P. Donor Age, Cold Ischemia Time, and Delayed Graft Function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020;15:813-21.
71. Boom H, Mallat MJ, Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int*. 2000;58:859-66.
72. Premasathian N, Avihingsanon Y, Ingsathit A, Pongskul C, Jittiganont S, Sumethkul V. Risk factors and outcome of delayed graft function after cadaveric kidney transplantation: a report from the Thai Transplant Registry. *Transplant Proc*. 2010;42:4017-20.
73. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:1039-47.

74. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, Doshi M, Poggio E, Marcus RJ et al. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:2995-3003.
75. Miglinas M, Supranaviciene L, Mateikaite K, Skebas K, Kubiliene A. Delayed graft function: risk factors and the effects of early function and graft survival. *Transplant Proc*. 2013;45:1363-7.
76. Doshi MD, Garg N, Reese PP, Parikh CR. Recipient risk factors associated with delayed graft function: a paired kidney analysis. *Transplantation*. 2011;91:666-71.
77. Puche-Sanz I, Flores-Martín JF, Vázquez-Alonso F. Cold ischemia and renal graft survival: a paired analysis comparing first and second grafts from the same donor. *Arch Esp Urol*. 2016;69:121-7.
78. Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay K, Legendre C, Kreis H, Mourad G et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney Int*. 2014;87:343-9.
79. Kayler LK, Magliocca J, Zendejas I, Srinivas TR, Schold JD. Impact of cold ischemia time on graft survival among ECD transplant recipients: a paired kidney analysis. *Am J Transplant*. 2011;11:2647-56.
80. Summers DM, Johnson RJ, Hudson A, Collett D, Watson CJ, Bradley JA. Effect of donor age and cold storage time on outcome in recipients of kidneys donated after circulatory death in the UK: a cohort study. *Lancet*. 2013;381:727-34.
81. Bronzatto EJ, da Silva Quadros KR, Santos RL, Alves-Filho G, Mazzali M. Delayed graft function in renal transplant recipients: risk factors and impact on 1-year graft function: a single center analysis. *Transplant Proc*. 2009;41:849-51.
82. Huraib S, Khudair W Al, Ghamdi G Al, Iqbal A. Post Transplant Acute Tubular Necrosis - How Long you can Wait?: a Case Report. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2002;13:50-4.
83. Ponticelli CE. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29:1134-40.

84. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant.* 2015;5:52-67.
85. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetyl choline. *Nature.* 1980;288:373-6.
86. Ćorić M. Patologija bubrežnog presatka. U: Bašić Jukić N, Kaštelan Ž. *Transplantacija bubrega.* Zagreb: Medicinska naklada; 2016. str. 206-21.
87. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet.* 2005; 365:417-30.
88. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure-definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the second international consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) group. *Crit Care.* 2004;8:204-12.
89. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet.* 2004;364:1814-27.
90. Ponticelli CE. The impact of cold ischemia time on renal transplant outcome. *Kidney Int.* 2015;87:272-75.
91. Aykul S, Martinez-Hackert E. Transforming Growth Factor- $\beta$  Family Ligands Can Function as Antagonists by Competing for Type II Receptor Binding. *J Biol Chem.* 2016; 291(20):10792–10804.
92. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150:893-99.
93. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988;242:1528-34.
94. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med.* 2005;352:1959-66.

95. Korchynsky O, van Bezooijen RL, Lowik CWGM, ten Dijke P. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation, U: Vukicevic S, Sampath TK. Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and beyond. Basel, Boston, Berlin: Birkhauser Verlag; 2004. str. 9-44.
96. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:160-6.
97. Štoković N, Ivanjko N, Matic Jelić I, Milešević M, Rumenović V, Blažević V et al. State-of-the-art of the Bone Morphogenetic Protein research field: 13th International BMP Conference, Dubrovnik 2022. *Medical Sciences.* 2022;84-99.
98. Ehata S, Miyazono K. Bone Morphogenetic Protein Signaling in Cancer; Some Topics in the Recent 10 Years. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:883523.
99. Chen D, Zhao M, Harris SE, Zenghui MI. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci* 2004;9:349-58.
100. Halloran D, Durbano HW, Nohe A. Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *J Dev Biol.* 2020;8(3):19.
101. Narasimhulu CA, Singla DK. The Role of Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7) in Inflammation in Heart Diseases. *Cells* 2020;9(2): 280.
102. Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362:550-3.
103. Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11:15-22.
104. Hassel S, Schmitt S, Hartug A, Roth M, Nohe A, Petersen N et al. Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complex. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:44-51.

105. Yanagita M. BMP antagonists: their role in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:309-17.
106. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal.* 2011;23:609-20.
107. Yuan C, Li X, Song H, Fan L, Su S, Dong B. BMP7 coordinates endometrial epithelial cell receptivity for blastocyst implantation through the endoglin pathway in cell lines and a mouse model. *Exp Ther Med.* 2019;17:2547-56.
108. Zhao HJ, Chang HM, Zhu H, Klausen C, Li Y, Leung PCK. Bone Morphogenetic Protein 2 Promotes Human Trophoblast Cell Invasion by Inducing Activin A Production. *Endocrinology.* 2018;159:2815-25.
109. Zhao GQ. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis.* 2003;35:43-56.
110. Papoutsis T, Luna-Zurita L, Prados B, Zaffran S, de la Pompa JL. Bmp2 and Notch cooperate to pattern the embryonic endocardium. *Development.* 2018;145(13):dev163378
111. Chen WC, Chung CH, Lu YC, Wu MH, Chou PH, Yen JY et al. BMP-2 induces angiogenesis by provoking integrin  $\alpha 6$  expression in human endothelial progenitor cells. *Biochem Pharmacol.* 2018;150:256-66.
112. Zeisberg M. Bone morphogenetic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:568-73.
113. Simic P, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:299-308.
114. Tsujimura T, Idei M, Yoshikawa M, Takase O, Hishikawa K. Roles and regulation of bone morphogenetic protein-7 in kidney development and diseases. *World J Stem Cells.* 2016;26:288-96.
115. Dyer LA, Pi X, Patterson C. The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25:472-80.



116. Xu CP, Ji WM, van den Brink GR, Peppelenbosch MP. Bone morphogenetic protein 2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation down regulated in the regenerating liver. *World J Gastroenterol.* 2006;12:7621-5.
117. Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS et al. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol.* 1999;276:382-9.
118. Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Basic N, Shih MS, A Shepard A et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest.* 1998;102:202-14.
119. Ćelić T, Omrčen H, Španjol J, Bobinac D. Mechanisms of Bone Morphogenetic Protein-7 Protective Effects Against Cold Ischemia-Induced Renal Injury in Rats. *Transplant Proc.* 2018(10):3822-30.
120. Zeisberg M, Kalluri R. Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights in to novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2008; 23:1395-8.
121. Chen X, Xu J, Jiang B, Liu D. Bone Morphogenetic Protein-7 Antagonizes Myocardial Fibrosis Induced by Atrial Fibrillation by Restraining Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smads Signaling. *Med Sci Monit.* 2016;22:3457-68.
122. Li X, An G, Wang Y, Liang D, Zhu Z, Lian X et al. Anti-fibrotic effects of bone morphogenetic protein-7-modified bone marrow mesenchymal stem cells on silica-induced pulmonary fibrosis. *Exp Mol Pathol.* 2017;102:70-7.
123. Zou GL, Zuo S, Lu S, Hu RH, Lu YY, Yang J et al.s. Bone morphogenetic protein-7 represses hepatic stellate cell activation and liver fibrosis *via* regulation of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. *World J Gastroenterol.* 2019;25:4222-34.

124. Chattopadhyay T, Singh RR, Gupta S, Surolia A. Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) augments insulin sensitivity in mice with type II diabetes mellitus by potentiating PI3K/AKT pathway. *Biofactors*. 2017;43:195-209.
125. Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA. The Regulation of Valvular and Vascular Sclerosis by Osteogenic Morphogens. *Circulation Research*. 2011;109:564-77.
126. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M et al. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika *Med Vjesn*. 2012;44:135-46.
127. Hernández D, Alonso-Titos J, Armas-Padrón AM, Lopez V, Cabello M, Sola E et al. Waiting List and Kidney Transplant Vascular Risk. *Kidney Blood Press Res*. 2020;45:1-7.
128. Viegas CSB, Simes DC. Gla-rich Protein (GRP): A New Player in the Burden of Vascular Calcification. *J Cardiovasc Dis Diagn* 4:245.
129. Escobar Guzman LF, Escobar Guzman CA, Moreira Lopes NH. Pathophysiological and Genetic Aspects of Vascular Calcification. *Cardiol Res Pract*. 2020:5169069.
130. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens B, Geusens PP, Kitslaar PJ et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1998-2003.
131. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 2005;97:105-14.
132. Schuchardt M, Siegel NV, Babic M, Reshetnik A, Lützenberg R, Zidek W et al. A Novel Long-Term ex vivo Model for Studying Vascular Calcification Pathogenesis: The Rat Isolated-Perfused Aorta. *J Vasc Res*. 2020;57:46-52.
133. Zhao Y, Cai Y, Cui LY, Tang W, Liu B, Zheng JJ et al. Suppression of Gut Bacterial Translocation Ameliorates Vascular Calcification through Inhibiting Toll-Like Receptor 9-Mediated BMP-2 Expression. *Oxid Med Cell Longev*. 2019:3415682.

134. Zhang L, Sun H, Liu S, Gao J, Xia J. Glycemic variability is associated with vascular calcification by the markers of endoplasmic reticulum stress-related apoptosis, Wnt1, galectin-3 and BMP-2. *Diabetol Metab Syndr*. 2019;11:67.
135. Krishnan P, Moreno PR, Turnbull IC, Purushothaman M, Zafar MU, Tarricone A et al. Incremental effects of diabetes mellitus and chronic kidney disease in medial arterial calcification: Synergistic pathways for peripheral artery disease progression. *Vasc Med*. 2019;24:383-94.
136. Issa H, Hénaut L, Abdallah JB, BoudotC, LengletG, AvondoC et al. Activation of the calcium-sensing receptor in human valvular interstitial cells promotes calcification. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;129:2-12.
137. Mathew S, Davies M, Lund R, Saab G, Hruska KA. Function and effect of bone morphogenetic protein-7 in kidney bone and the bone-vascular links in chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest*. 2006;36:43-50.
138. Gravesen E, Lerche Mace M, Nordholm A, Hofman-Bang J, Hruska K, Haagen Nielsen C et al. Exogenous BMP7 in aortae of rats with chronic uremia ameliorates expression of profibrotic genes, but does not reverse established vascular calcification. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190820.
139. Singla DK, Singla R, Wang J. BMP-7 Treatment Increases M2 Macrophage Differentiation and Reduces Inflammation and Plaque Formation in Apo E<sup>-/-</sup> Mice. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147897.
140. Oštrić M, Kukuljan M, Markić D, Gršković A, Ivančić A, Bobinac D et al. Expression of bone-related proteins in vascular calcification and its serum correlations with coronary artery calcification score. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2019;1:29-38.
141. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:1731-40.
142. Bover J, Evenepoel P, Ureña-Torres P, Vervloet MG, Brandenburg V, Mazzaferro S et al. Pro: Cardiovascular calcifications are clinically relevant. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30:345-51.

143. Yang P, Troncone L, Augur ZM, Kim SSJ, McNeil ME, Yu PB. The role of bone morphogenetic protein signaling in vascular calcification. *Bone*. 2020;141:115542.
144. Dalfino G, Simone S, Porreca S, Cosola C, Balestra C, Manno C et al. Bone morphogenetic protein-2 may represent the molecular link between oxidative stress and vascular stiffness in chronic kidney disease. *Atherosclerosis*. 2010; 211:418-23.
145. Buendía P, Montes de Oca A, Madueño JA, Merino A, Martín-Malo A, Aljama P, et al. Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification. *FASEB J*. 2015;29:173-81.
146. Erpicum P, Pinto Coelho T, Bonvoisin C, Bouquegneau A, Grosch S, Navez M et al. Delayed graft function: an ongoing clinical challenge. *Rev Med Liege*. 2023;78:107-13.
147. Kernig K, Albrecht V, Dräger DL, Führer A, Mitzner S, Kundt G et al. Predictors of Delayed Graft Function in Renal Transplantation. *Urol Int*. 2022;106:512-17.
148. Rijkse E, van Dam JL, Roodnat JI, Kimenai HJAN, IJzermans JNM, Minnee RC. The prognosis of kidney transplant recipients with aorto-iliac calcification: a systematic review and meta-analysis. *Transpl Int*. 2020;33(5):483-96.
149. Benjamens S, Alghamdi SZ, Rijkse E, Te Velde-Keyzer CA, Berger SP, Moers C et al. Aorto-Iliac Artery Calcification and Graft Outcomes in Kidney Transplant Recipients. *J Clin Med*. 2021;10(2):325.
150. Alappan HR, Vasanth P, Manzoor S, O'Neill WC. Vascular Calcification Slows But Does Not Regress After Kidney Transplantation. *Kidney Int Rep*. 2020;5(12):2212-17.
151. Sigrist MK, Taal MW, Bungay P, McIntyre CW. Progressive vascular calcification over 2 years is associated with arterial stiffening and increased mortality in patients with stages 4 and 5 chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2(6):1241-8.
152. Sigrist M, Bungay P, Taal MW, McIntyre CW. Vascular calcification and cardiovascular function in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:707-14.

153. Žuža I, Dodig D, Brumini I, Tokmadžić D, Orlić L, Zgrablić D, Vukelić I, Gršković A, Katalinić N, Jakšić A, Miletić D, Rački S, Markić D. A CT-based pelvic calcification score in kidney transplant patients is a possible predictor of graft and overall survival. *Br J Radiol.* 2022;95(1139):20220394.
154. Dai L, Debowska M, Lukaszuk T, Bobrowski L, Barany P, Söderberg M et al. Phenotypic features of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Intern Med.* 2020;287:422-34.
155. Lee SJ, In-Kyu Lee I-K, Jeon J-H. Vascular Calcification-New Insights into Its Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8): 2685.
156. Lee CT, Kuo WH, Tain YL, Wang Y, Lee WC. Exogenous BMP7 administration attenuated vascular calcification and improved bone disorders in chronic uremic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;621:8-13.
157. Liberman M, Johnson RC, Handy DE, Loscalzo J, Leopold JA. Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;413:436-41.
158. Petković N, Marić R, Gajanin R, Batinić D, Čuk M, Ristić S et al. Prevalence and risk factors of vascular calcification in pre-dialysis patients with Balkan endemic nephropathy. *Srp Arh Celok Lek.* 2016;144(11-12):608-14.
159. Zoccali C, London G. Con: Vascular calcification is a surrogate marker, but not the cause of ongoing vascular disease, and it is not a treatment target in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30:352-357.
160. Li G, Qiao W, Zhang W, Li F, Shi J, Dong N. The shift of macrophages toward M1 phenotype promotes aortic valvular calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017;153(6):1318-27.

161. Carmona A, Guerrero F, Jimenez MJ, Ariza F, Agüera ML, Obrero T et al. Inflammation, Senescence and MicroRNAs in Chronic Kidney Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:739.
162. Fellmann M, Balssa L, Clément E, Frey P, Frontczak A, Bernardini S et al. Postoperative complications and long-term outcomes of transplantation with expended criteria donors transplants. *Prog Urol.* 2020;30:655-62.
163. Luo Y, Dong Z, Hu X, Tang Z, Zhang J, Deng W et al. Donor Death Category Is an Effect Modifier Between Cold Ischemia Time and Post-transplant Graft Function in Deceased-Donor Kidney Transplant Recipients. *Front Med.* 2021;8:743085.
164. Jansen MPB, Pulskens WPC, Uil M, Claessen N, Nieuwenhuizen G, Standaar D et al. Urinary mitochondrial DNA associates with delayed graft function following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2020;35(8):1320-27.
165. Meier-Kriesche HU, Arndorfer JA, Kaplan B. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft failure and patient death. *Transplantation* 2002;73:70-4.
166. Parekh J, Bostrom A, Feng S. Diabetes mellitus: a risk factor for delayed graft function after deceased donor kidney transplantation. *Am J Transplant* 2010;10:298-303.
167. Palmisano A, Gandolfini I, Delsante M, Cantarelli C, Fiaccadori E, Cravedi P et al. Acute Kidney Injury (AKI) before and after Kidney Transplantation: Causes, Medical Approach, and Implications for the Long-Term Outcomes. *J Clin Med.* 2021;10(7):1484.
168. Quaglia M, Merlotti G, Guglielmetti G, Castellano G, Cantaluppi V. Recent Advances on Biomarkers of Early and Late Kidney Graft Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:5404.
169. Ye Y, Han F, Ma M, Sun Q, Huang Z, Zheng H et al. Plasma Macrophage Migration Inhibitory Factor Predicts Graft Function Following Kidney Transplantation: A Prospective Cohort Study. *Front Med.* 2021;8:708316.
170. Tepel M, Alkaff FF, Kremer D, Bakker SJL, Thauinat O, Nagarajah S et al. Pretransplant endotrophin predicts delayed graft function after kidney transplantation. *Sci Rep.* 2022;12(1):4079.

171. Wang Y, Jia Y, Wang C, Gao X, Liu Y, Yue B. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin rapidly decreases in the first week after kidney transplantation. *J Clin Lab Anal.* 2020;34(10):e23445.
172. Maier HT, Ashraf MI, Denecke C, Weiss S, Augustin F, Messner F et al. Prediction of delayed graft function and long-term graft survival by serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin during the early postoperative phase after kidney transplantation. *PLoS ONE.* 2018;13:e0189932.
173. Khalid U, Newbury LJ, Simpson K, Jenkins RH, Bowen T, Bates L et al. A urinary microRNA panel that is an early predictive biomarker of delayed graft function following kidney transplantation. *Sci. Rep.* 2019;9:3584.
174. Figuer A, Alique M, Valera G, Serroukh N, Ceprián N, de Sequera P et al. New mechanisms involved in the development of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Nefrologia.* 2023;43:63-80.
175. Manzano-Lista FJ, Sanz-Gómez M, González-Moreno D, Vega-Martín E, Gil-Ortega M, Schulz A et al. Imbalance in Bone Morphogenic Proteins 2 and 7 Is Associated with Renal and Cardiovascular Damage in Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):40
176. Valtuille RA, Rossi G, Gimenez E. Protective Effect of Autologous Arteriovenous Fistulae Against Oxidative Stress in Hemodialyzed Patients. *Cureus* 2021;13(6): e15398.
177. Costa E, Coimbra J, Catarino C, Ribeiro S, Reis F, Nascimento H et al. Major determinants of BMP-2 serum levels in hemodialysis patients. *Ren Fail.* 2012;34:1355-8.
178. Liu D, Szeto WY, Laudanski K. Elevated Serum Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23) Perseveres into a Convalescence Period After Elective Cardiac Surgery, with Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand (RANKL) and Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) Being Part of the Peri-Surgical -Pro-Arteriosclerotic Inflammatory Response. *Med Sci Monit.* 2023;29:e937934.
179. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* 2014;5:511.

180. Lončarić A, Čelić T. Serumska ekspresija OPG/RANKL sustava u kroničnoj bubrežnoj bolesti i kod primatelja bubrežnog transplantata: odnos sa serumskom razinom IPTH-a i terapijom vitaminom D. *Medicina Fluminensis* 2020;56:529-36.
181. Kercheva M, Guskova AM, Ryabova TR, Suslova TE, Kzhyshkowska J, Ryabov VV. Serum Levels of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Cells*. 2020;9(10):2179.
182. Ebel H, Hillebrand I, Arlt S, Zhang Y, Kostin S, Neuhaus H et al. Treatment with bone morphogenetic protein 2 limits infarct size after myocardial infarction in mice. *Shock* 2013;39:353-60.
183. Duranay M, Segall L, Sen N, Yilmaz FM, Cetin M, Isleyen A, Kanbay M, Covic A. Bone morphogenetic protein-7 serum level decreases significantly in patients with contrast-induced nephropathy. *Int Urol Nephrol*. 2011;43(3):807-12.
184. Furic-Cunko V, Kes P, Coric M, Hudolin T, Kastelan Z, Basic-Jukic N. Expression of bone morphogenetic proteins 4, 6 and 7 is downregulated in kidney allografts with interstitial fibrosis and tubular atrophy. *Int Urol Nephrol*. 2015;47:1219-29.
185. Miao C, Qin D, Cao P, Lu P, Xia Y, Li M et al. BMP2/7 heterodimer enhances osteogenic differentiation of rat BMSCs via ERK signaling compared with respective homodimers. *J. Cell. Biochem*. 2018;120:8754–8763.
186. Kim HS, Neugebauer J, McKnite A, Tilak A, Christian JL. BMP7 functions predominantly as a heterodimer with BMP2 or BMP4 during mammalian embryogenesis. *eLife* 2019;8:e48872.
187. Nickel J, Mueller TD. Specification of BMP Signaling. *Cells*. 2019;8(12):1579.
188. Liu H, Zhang R, Chen D, Oyajobi BO, Zhao M. Functional redundancy of type II BMP receptor and type IIB activin receptor in BMP2-induced osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*. 2012;227:952-63.



189. Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M, Wrana JL. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem.* 1998;273:25628-25636.

190. Perron JC, Dodd J. ActRIIA and BMPRII Type II BMP receptor subunits selectively required for Smad4-independent BMP7-evoked chemotaxis. *PLoS ONE.* 2019;4:e8198.

## 8. SAŽETAK

Transplantacija bubrega je najbolja metoda liječenja završnog stadija zatajenja funkcije bubrega. Neželjeni je ishod transplantacijskog liječenja odgođena funkcija transplantata (DGF) zbog čega je potrebno nastaviti dijalizno liječenje dulje od 7 dana nakon transplantacijskog postupka. Kardiovaskularna patologija primatelja bubrega jedan je od brojnih čimbenika koji utječu na transplantacijski ishod. Uspjeh transplantacijskog liječenja ovisi o prisutnosti i opsežnosti vaskularnih kalcifikata koji otežavaju formiranje vaskularnih anastomoza. Ozljeda i posljedična disfunkcija endotelne stanice s razvojem vaskularnih kalcifikata u miljeu kronične upale u uremiji česta je u primatelja bubrega i pridonosi ishemijskom i imunološkom oštećenju transplantata. Patološki proces nastanka vaskularnih kalcifikacija u intimi i mediji arterijske stijenke nalik je fiziološkom procesu izgradnje kosti, a u oba procesa sudjeluju BMP-2 i BMP-7. Izraženost i aktivnost BMP-2 u endotelu i VSMC arterija je osteoinduktivna ; BMP-2 promotor je nastanka vaskularnih kalcifikacija, a BMP-7 inhibira nastanak vaskularnih kalcifikacija. Unatoč oprečnim aktivnostima u aterosklerotskoj kalcificirajućoj vaskularnoj patologiji oba BMP-a preveniraju ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu koja je neizbježna u transplantacijskom liječenju, a o čijem intenzitetu i trajanju ovisi rana funkcija transplantata. Našim istraživanjem pokušali smo odgovoriti na pitanje da li je izraženost BMP-2 i BMP-7 u endotelnim i VSMC epigastrične arterije ogranka ilijačne arterije na koju se anastomozira renalna arterija transplantiranog bubrega povezana sa ranim transplantacijskim ishodom.

Veća endotelna izraženost BMP-2 najjači je prediktor promptne funkcije transplantata (IGF) a ne DGF što je suprotno postavljenoj hipotezi. Ispitanici koji nisu imali endotelnu izraženost BMP-2 gotovo u pravilu su imali DGF, dok su ispitanici sa većom endotelnom izraženošću BMP-2 imali manje izgleda za DGF i to je ostalo statistički značajno i nakon prilagodbe za dob, spol, BMI, pušenje i anamnezu arterijske hipertenzije, šećerne bolesti, kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti (za ispitanike i darivatelje), duljinu liječenja dijalizom, vrijeme hladne ishemije, MM. Za razliku od BMP-2, endotelna izraženost BMP-7 nije se razlikovala u ispitanika sa IGF i onih sa DGF.

Endotelna izraženost BMP-2 manja je u primatelja bubrega no u kontrolnoj skupini uredne bubrežne funkcije, manja je u dulje liječenih dijalizom, a ne razlikuje se u ispitanika s i bez vaskularnih makrokalcifikata. Oprečno od BMP-2, endotelnu izraženost BMP-7 pratila je i

izraženost u VSMC; veće su u dulje liječenih dijalizom i u ispitanika sa vaskularnim makrokalifikatima.

DGF povećava rizik za akutno odbacivanje transplantata, razvoj fibroze, lošiju kratkoročnu i dugoročnu funkciju transplantata. Rezultati našeg istraživanja upućuju da bi endotelna (ne)izraženost BMP-2 mogla biti prediktivni biomarker DGF.

Iako su mnogobrojna *in vitro* istraživanja na kulturama stanica tijekom proteklih 20-tak godina rasvijetlila sintezu BMP-2 i BMP-7, afinitete i kinetiku vezanja za stanične receptore, unutarstaničnu signalizaciju i upute stanici „što treba napraviti“, ove spoznaje nije jednostavno implementirati u humanu patologiju. Brojnost, složenost i isprepletenost patofizioloških dešavanja na staničnoj, tkivnoj i organskoj razini u KBBbolesnika koji nadomještaju bubrežnu funkciju dijalizom zasigurno utječu na sintezu, signalizaciju i aktivnost BMP-ova i moguće se razlikuju se od onih u kulturama stanica i životinjskim modelima KBB-a, što pokazuju i naši rezultati. Potvrdu ovog razmišljanja dati će buduća istraživanja.

## 10. ABSTRACT

Kidney transplantation is the best treatment for end-stage renal failure. An unwanted outcome of transplant treatment is delayed graft function (DGF), which is why it is necessary to continue dialysis treatment for longer than 7 days after the transplant procedure.

Cardiovascular pathology of the kidney recipients is one of the many factors that influence the transplant outcome. The success of transplant treatment depends on the presence and extent of vascular calcifications, which hinder the formation of vascular anastomoses. Injury and consequent dysfunction of endothelial cells with the development of vascular calcifications in the milieu of chronic inflammation in uremia is common in kidney recipients and contributes to ischemic and immune damage of the transplant. The pathological process of the formation of vascular calcifications in the intima and media of the arterial wall is similar to the physiological process of bone building, and BMP-2 and BMP-7 participate in both processes. The expression and activity of BMP-2 in the endothelium and VSMC of arteries is osteoinductive; BMP-2 is a promoter of the formation of vascular calcifications. BMP-7 inhibits the formation of vascular calcifications. Despite their opposing activities in atherosclerotic calcifying vascular pathology, both BMPs prevent ischemia-reperfusion injury, which is inevitable in transplant treatment, and on whose intensity and duration the early function of the graft depends. With our research, we tried to answer the question whether the expression of BMP-2 and BMP-7 in the endothelial and VSMC of the epigastric artery branch of the iliac artery, to which the renal artery of the transplanted kidney is anastomosed, is related to the early transplant outcome.

Higher endothelial expression of BMP-2 is the strongest predictor of immediate graft function (IGF) and not DGF, which is contrary to the hypothesis. Subjects who did not have endothelial expression of BMP-2 almost always had DGF, while subjects with higher endothelial expression of BMP-2 were less likely to have DGF and this remained statistically significant even after adjustment for age, sex, BMI, smoking and medical history arterial hypertension, diabetes, cardiovascular and cerebrovascular diseases (for subjects and donors), time of dialysis treatment, cold-ischemia time, MM. Unlike BMP-2, the endothelial expression of BMP-7 did not differ between subjects with IGF and those with DGF.

Endothelial expression of BMP-2 is lower in kidney recipients than in the control group with normal kidney function, it is lower in those treated with dialysis for a long time, and it does not differ in subjects with and without vascular macrocalcifications. Contrary to BMP-2, the

endothelial expression of BMP-7 was followed by the expression in VSMC; they are higher in long-term dialysis patients and in subjects with vascular macrocalcifications.

DGF increases the risk for acute graft rejection, development of fibrosis, worse short-term and long-term graft function. Unexpected results of our study suggest that endothelial (non)expression of BMP-2 could be a predictive biomarker of DGF.

Although numerous in vitro studies on cell cultures over the past 20 years have shed light on the synthesis of BMP-2 and BMP-7, the affinities and kinetics of binding to cell receptors, intracellular signaling and instructions to the cell "what to do", these findings are not easy to implement in human pathology. The number, complexity and intertwining of pathophysiological events at the cellular, tissue and organ level in CKD patients who replace renal function with dialysis certainly affect the vascular synthesis, signaling and activity of BMPs and possibly differ from those in cell cultures and animal models of CKD, which our results also show. Future research will confirm this thinking.

## 10. ŽIVOTOPIS

Marijana Gulin rođena je 31. srpnja 1967. godine u Zagrebu, Republika Hrvatska. Osnovno i srednješkolsko obrazovanje završila u Šibeniku. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu 15. srpnja 1991. godine. Završila je Magistarski studij iz područja Biomedicine-Imunologija na Prirodoslovno- matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu i obranila Magistarski rad naslova „Učinci galij-arsen lasera na zacjeljivanje oštećenja kože (ulcus cruris)“ 05. prosinca 1997. godine. Specijalistički ispit iz Interne medicine položila je pred Komisijom Ministarstva zdravstva 12. prosinca 2001. godine, a subspecijalistički ispit iz Nefrologije 02. ožujka 2008. godine. U rujnu 2017. godine prema uvjetima Ministarstva zdravstva stekla je naslov primarijusa.

Radila je u Općoj bolnici Šibensko kninske županije od 15. srpnja 1996. godine, na radnom mjestu interniste, subspecijaliste nefrologa. Obnašala je dužnost voditeljice Dijalize od 1. siječnja 2015. godine, a od 30. kolovoza 2018. godine i dužnost Voditeljice Internog odjela. Od listopada 2021. zaposlena je u Poliklinici Affidea Vita Šibenik.

Publicirala je više znanstvenih članaka u recenziranim znanstvenim i stručnim časopisima i aktivno sudjelovala na međunarodnim kongresima. Do sada je u časopisima indeksiranim u Curent Contentst publicirala 6 radova, od kojih je na 2 prvi autor. Koautorica je poglavlja u dvama knjigama, od kojih je jedna Sveučilišni udžbenik.

Sudjelovala je u izradi brojnih smjernica o dijagnostici i liječenju bubrežnih bolesti pod pokroviteljstvom Hrvatskog društva za nefrologiju dijalizu i transplantaciju Hrvatskog liječničkog zbora.

Bila je član Stručnog odbora 7. Kongresa Hrvatskog društva za nefrologiju dijalizu i transplantaciju (HDNDT) sa međunarodnim učešćem u Puli 2014. godine, te 8. Kongresa Hrvatskog društva za nefrologiju dijalizu i transplantaciju (HDNDT) sa međunarodnim učešćem u Vodicama-Šibenik 2017. godine.

U dva mandata od 2012.-2020. bila je član Upravnog odbora Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju.

Član je Hrvatskog liječničkog zbora od 1994. godine, Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju od 2002. godine, Europskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju od 2010. godine.

## **MAGISTARSKI RAD**

**Gulin Marijana.** Učinci galij-arsen lasera na zacijeljivanje oštećenja kože (ulcus cruris). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 05.12.1997. , 106 str. Voditelj Jurin Mislav

## **KOAUTHORSTVO U KNJIGAMA:**

Predovan G, Klarić D, **Gulin M.** Laboratorijski i funkcijski testovi adekvatnosti peritonealne dijalize. U: Bašić Jukić N, Rački S ur. Peritonealna dijaliza. Medicinska Naklada 2017. str.71-79.

Čivljak R, **Gulin M.** Akutno oštećenje bubrega u osoba zaraženih virusom humene imunodeficijencije. U: Kes P ur. Akutno oštećenje bubrega. Medicinska Naklada 2019. str. 247-257.

## **POPIS OBJAVLJENIH RADOVA**

### **ZNANSTVENI RADOVI CITIRANI U CURRENT CONTENTS-u**

1. Basic-Jukić N, **Gulin M**, Slaviček J, Ćorić-Martinović V, Iskra B, Rački S, Šain M, Ostojić R, Hrštić I, Ljutić D. Pegylated Interferon for Treatment of Chronic Hepatitis C in Hemodialysis Patient in Croatia. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34:53-7. doi: 10.1159/000322922.

2. Mikolašević I, Milić S, Štimac D, Zaputović L, Lukenda Žanko V, Gulin T, Jakopčić I, Klarić D, **Gulin M**, Orlić L. Is there a relationship between hypomagnesemia and proton-pump inhibitors in patients on chronic hemodialysis? *Eur J Intern Med.* 2016;30:99-103. doi: 10.1016/j.ejim.2016.01.026.

3. Bašić-Jukić N , **Gulin M**, Hudolin T, Kaštelan Ž, Katalinic L, Coric M, Varnai VM, Ivković V, Kes P, Jelakovic B. Expression of BMP-2 in vascular endothelial cells of recipient may predict delayed graft function after renal transplantation. *Kidney Blood Press Res.* 2016;41:781-93. doi: 10.1159/000450568. (*Nikolina Bašić-Jukić i Marijana Gulin dijele prvo autorstvo*)

4. **Gulin M**, Klarić D, Ilić M, Radić J, Kovačić V, Šain M. Blood Pressure of Maintenance Hemodialysis Patients in the Dalmatian Region of Croatia: Differences between Hospital and Out-of-Hospital Dialysis Centers. *Blood Purif* 2017;44:110-21. doi: 10.1159/000474931

5. Radić J, Bašić Jukić N, Vujičić B, Klarić D, Radulović G, Jakić M, Jurić K, Altabas K, Grđan Z, KovačevićVojtušek I, Ćorić-Martinović V, Janković N, **Gulin M**, Ljutić D, Rački S. Anaemia Is Correlated with Malnutrition and Inflammation in Croatian Peritoneal Dialysis Patients: A Multicentre Nationwide study. *Perit Dial Int.* 2017;37(4):472-75.

6. Mrzljak A, Dinjar-Kujundžić P, Knotek M, Kudumija B, Ilić M, **Gulin M**, Zibar L, Hrčić I, Jureković Z, Kolarić B, Jemeršić L, Prpić J, Tomljenović M, Vilibić-Čavlek T. Seroepidemiology of hepatitis E in patients on haemodialysis in Croatia. *International Urology and Nephrology*, 52 (2020),2;371-78  
doi:10.1007/s11255-019-02363-3

#### ZNANSTVENI RADOVI

7. **Gulin M**, Čivljak R, Bašić-Jukić N, Gulin M . Infectious complications in kidney transplant recipients in the first year after transplantation: a single-centre experience from the Šibenik-Knin County Hospital. *Acta Med Croatica* 2014;2:121-27.

8. Klarić D, Bašić Jukić N, Kes P, Rački S, Vujičić B, Radić J, Jakić M, Altabas M, Kovačević Vojtušek I, Janković N, Radulović G, Grđan Ž, Jurić K, Ćorić Martinović V, **Gulin M**. Peritonejska dijaliza i hipertenzija-što nam govore podaci. *Acta medica Croatica* 2014;2:75-79.



9. Radić J, Bašić Jukić N, Vujičić B, Klarić D, Radulović G, Jakić M, Jurić K, Altabas K, Grđan Z, Kovačević Vojtušek I, Čorić-Martinović V, Janković N, **Gulin M**, Ljutić D, Rački S. Correlation of Residual Diuresis with Mis Score and Nutritional Status in Peritoneal Dialysis Patients: A Croatian Nationwide Study. *Bantao J* 2015;2:58-67.

### **STRUČNI i PREGLEDNI RADOVI**

10. **Gulin M**, Čivljak R, Đogić V. Infekcija hepatitis G virusom (HGV) u bolesnika liječenih kroničnom hemodijalizom u Šibensko-kninskoj županiji. *Infektološki glasnik* 2007. 27;4:171-75.

11. **Gulin M**, Slaviček J, Bašić-Jukić N, Kes P, Purić Z, Bubić-Filipi Lj. The outcome of kidney transplantation in patients with chronic viral hepatitis. *Acta Med Croatica*. 2011;65(4):315-21.

12. Rački S, Bašić-Jukić N, Kes P, Ljutić D, Lovčić V, Prkačin I, Radić J, Vujičić B, Bubić I, Jakić M, Belavić Ž, Šefer S, Pehar M, Klarić D, **Gulin M** u ime Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju. Liječenje anemije u kroničnoj bubrežnoj bolesti-stav Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju i osvrt na preporuke KDIGO i ERBP. *Acta Med Croatica*. 2014 Apr;68(2):215-21.

13. Rački S, Bašić-Jukić N, Kes P, Ljutić D, Vujičić B, Lovčić V, Orlić L, Prkačin I, Radić J, Jakić M, Klarić D, **Gulin M**. Kako prevenirati i liječiti proteinsko-energetsku pothranjenost u bolesnika s kroničnom bolešću bubrega – osvrt Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju na preporuke Međunarodnog društva za prehranu bubrežnih bolesnika. *Acta Med Croatica*. 2014 Apr;68(2):191-99.

14. Bašić-Jukić N, Radić J, Klarić D, Jakić M, Vujičić B, **Gulin M**, Krznarić Ž, Pavić E, Kes P, Jelaković B, Rački S. Preporuke za praćenje, prevenciju i liječenje proteinsko-energijske pothranjenosti u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti. *Lijec Vjesn*. 2015 Jan-Feb;137(1-2):1-8.

15. Bašić-Jukić N, Pavlović D, Šmalcelj R, Tomić-Brzac H, Orlić L, Radić J, Vujičić B, Lovčić V, Pavić E, Klarić D, **Gulin M**, Spasovski G, Ljutić D, Đanić D,

Prgomet D, Resić H, Ratković M, Kes P, Rački S. Smjernice za praćenje, prevenciju i liječenje poremećaja koštano-mineralnog metabolizma u bolesnika sa kroničnom bubrežnom bolesti. *Liječ Vjesn.* 2016;138:107-20.

16. **Gulin M**, Puretić Z, Begovac J, Čivljak R, Janković N, Bašić-Jukić N, Rački S. Croatian Recommendations for the Dialysis of HIV-Positive Patients. *Bantao J.* 2016; 14:1-7.

17. **Gulin M**, Bašić-Jukić N. Liječenje pegiliranim interferonom prije transplantacije poboljšava transplantacijski ishod u dijaliziranih bolesnika inficiranih virusom hepatitisa C. *Acta Med Croatica.* 2018;267-75.

18. **Gulin M**, Čivljak R, Bubić I, Knotek M, Miletić-Medved M. Smjernice za prevenciju pneumokoknih bolesti cijepljenjem u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti. *Liječ Vjesn* 2019;141:57–62. doi.org/10.26800/LV-141-3-4-9

19. **Gulin M**, Zibar L, Huljev Ž, Vučur K, Laganović M. Preporuke za prevenciju infekcije humanim papilomavirusima (HPV) u primatelja bubrežnog presatka Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju. *Liječ Vjesn.* 2022;144:67-71. doi.org/10.26800/LV-144-3-4-1