



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Jurica Vuković

**EKSPRESIJA MOLEKULE BUBREŽNE OZLJEDE-1 (KIM-1) I MATRIKS
METALOPROTEINAZE-3 (MMP-3) U AKUTNOM ISHEMIJSKO-
REPERFUZIJSKOM OŠTEĆENJU BUBREGA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof.dr.sc. Ingrid Prkačin

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Jurica Vuković

**EXPRESSION OF THE KIDNEY INJURY MOLECULE-1 (KIM-1) AND
MATRIX METALLOPROTEINASE-3 (MMP-3) IN ISCHEMIA-
REPERFUSION ACUTE KIDNEY INJURY**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: prof.dr.sc. Ingrid Prkačin

Zagreb, 2024.

“Ovaj je doktorski rad izrađen u Kliničkoj bolnici Merkur, pod vodstvom prof.dr.sc. Ingrid Prkačin, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu”.

Informacije o mentorici:

Redoviti prof. dr. sc. Ingrid Prkačin, prim.dr med, diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1988. godine. Nakon obavljenog obaveznog liječničkog pripravničkog staža 1988/1989, radila je kao liječnik znanstveni novak na Klinici za urologiju Kliničke bolnice „Ozren Novosel“ (današnja Klinička bolnica „Merkur“) u Zagrebu od 1989-1992.

Poslijediplomski studij medicinskih znanosti Onkologije upisala je 1989. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Magistrirala je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 1994.godine. Specijalistički ispit položila je 1996. godine. Od 1996. godine odjelni je liječnik na Odjelu za Nefrologiju KB Merkur, te voditelj Nefrološke dnevne bolnice do 2011. godine. Od 2011. godine kada postaje specijalist hitne medicine obnaša dužnost Pročelnice kliničke jedinice za hitnu i internu medicinu, a od 2014. godine do daljnjega Pročelnica je poliklinike i hitne interne, Klinike za unutarnje bolesti u Kliničkoj bolnici Merkur u Zagrebu.

Od 1996/1997. godine predaje u okviru dodiplomske i poslijediplomske nastave na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Educirala je brojne studente, liječnike pripravnike i specijalizante interne medicine, nefrologije, te specijalizante drugih struka. Godine 2000. brani doktorat znanosti na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu a 2004. postaje znanstveni suradnik i viši asistent. Godine 2002. ima status užeg specijaliste iz nefrologije, a 2007. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske dodijelilo joj je naziv primarius.

Naslovni docent na Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu postala je 2009., viši znanstveni suradnik 2013. godine, a 2015. izvanredni profesor u naslovnom zvanju. Godine 2023. postaje redoviti profesor na Sveučilištu u Zagrebu Medicinskog Fakulteta.

Član je Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Merkur više od deset godina.

Kao član organizacijskog i znanstvenog odbora sudjelovala je u organiziranju kongresa poput Hrvatskog kongresa nefrologije, dijalize i transplantacije u Splitu 2011. godine, 6. Kongresa Hitne medicine s međunarodnim učešćem u Vodicama 2022. godine, 1.kongresa Hrvatskog društva za bubreg u Zagrebu 2022.godine.

Član je Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ), Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju (HDNDT), Hrvatskog društva za hipertenziju (HDH), Hrvatskog društva za hitnu medicinu (HDHM), Hrvatskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju (HDAKI). U opetovanom mandatu član je upravnog odbora Hrvatskog društva za hipertenziju više od 10 godina.

Bila je član je upravnog odbora Hrvatskog društva za hitnu medicinu od 2018. do 2022. godine. Član je Povjerenstva za odličja HLZ za mandatno razdoblje 2021.-2025. godine. Dugogodišnji je član međunarodnih znanstvenih društava i to Europskog društva za hipertenziju (ESH), Internacionalnog društva hipertenzijologa (ISH), Internacionalnog udruženja nefrologa (ISN), Europskog renalnog udruženja/Europskog udruženja za dijalizu i transplantaciju (ERA/EDTA). Status Europskog hipertenzijologa je dodijeljen 2014.godine do daljnjega. Član je (od 2018. godine-do daljnjega): ESH Member of the WG on Hypertension and the Brain.

Zahvala

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Ingrid Prkačin na stručnom vodstvu i pomoći pri izradi ove disertacije. Zahvaljujem Đidiju Delaliću, dr.sc. Juraju Jugu i prof.dr.sc. Milošu Miloševiću na statističkoj obradi i prikazu podataka. Zahvaljujem prof.dr.sc. Mariju Laganoviću na dozvoli za prikupljanje podataka na Zavodu za nefrologiju KB Merkur te zahvala prof.dr.sc. Danici Ljubanović-Galešić na dozvoli za korištenje uzoraka i prikupljanje podataka na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Dubrava u Zagrebu. Hvala prof.dr.sc. Mladenu Knoteku na inicijativi i podršci u istraživanju. Zahvaljujem prof.dr.sc. Aniti Škrtić na strpljenju i pomoći oko analize uzoraka te Suzani Hančić, mag.med.lab.diag. i cijelom timu laboratorija Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur za provođenje imunohistokemijskog bojenja i ostalih tehničkih postupaka vezanih uz istraživanje. Posebna zahvala cijelom transplantacijskom timu KB Merkur te kolegama iz Odjela za urologiju KB Merkur na podršci i savjetima. Hvala M na strpljenju!

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

**EKSPRESIJA MOLEKULE BUBREŽNE OZLJEDE-1 (KIM-1) I MATRIKS
METALOPROTEINAZE-3 (MMP-3) U AKUTNOM ISHEMIJSKO-
REPERFUZIJSKOM OŠTEĆENJU BUBREGA**

JURICA VUKOVIĆ

Klinička bolnica Merkur

Tijekom transplantacije bubrežni presadak prolazi ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje. Uslijed ishemijskog oštećenja epitelne stanice tubula ekspimiraju molekulu bubrežne ozljede-1 (KIM-1), kojom stječu fagocitna svojstva. Matriks metaloproteinaza-3 (MMP-3) sudjeluje u odvajanju ektodomene KIM-1 s površine epitelnih stanica tubula. Cilj ovog doktorata bio je odrediti povezanost ekspresije KIM-1 i MMP-3 u bioptičkim uzorcima presađak bubreaga s obnovom strukture i funkcije tubula tijekom 12 mjeseci nakon transplantacije. Istraživanje je bilo retrospektivno, uzorkovano je 38 presađak bubreaga. Prisutno je poboljšanje bubrežne funkcije te porast ekspresije MMP-3 i KIM-1 u uzorcima s akutnim staničnim odbacivanjem (ACR, engl. Acute Cellular Rejection) 12 mjeseci nakon transplantacije. Porast gradusa MMP-3 može predvidjeti ACR i time može poslužiti kao koristan biomarker za akutno odbacivanje i disfunkciju bubreaga.

(125 stranica, 15 slika, 39 tablica, 125 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: bubreag, KIM-1, MMP-3, ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje, transplantacija.

Mentor: prof.dr.sc. Ingrid Prkačin

Ocjenjivači: prof.dr.sc. Mario Laganović, prof.dr.sc. Anita Škrtić, prof.dr.sc. Maja Matulić i prof.dr.sc. Inga Urlić.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

**EXPRESSION OF THE KIDNEY INJURY MOLECULE-1 (KIM-1) AND
MATRIX METALLOPROTEINASE-3 (MMP-3) IN ISCHEMIA-
REPERFUSION ACUTE KIDNEY INJURY**

JURICA VUKOVIĆ
Merkur Clinical Hospital

A renal graft undergoes ischemia-reperfusion injury during transplantation. Following injury, tubular epithelial cells express the kidney injury molecule-1 (KIM-1), which confers a phagocytic property to them. The matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) has a role in KIM-1 Ectodomain shedding. The objective of this PhD thesis was to examine a correlation between KIM-1 and MMP-3 expression in kidney graft biopsies with mechanism of morphological and functional recovery during 12 months after the transplantation. Our study was retrospective, biopsy samples from 38 kidney allograft were analyzed. There was significant improvement of allograft function and increased expression of KIM-1 and MMP-3 in allograft biopsy specimens with acute cellular rejection (ACR) 12 months after transplantation. The increase of MMP-3 expression may predict ACR and may serve as a biomarker for acute rejection and kidney dysfunction.

(125 pages, 15 figures, 39 tables, 125 references, original in Croatian language)

Keywords: kidney, KIM-1, MMP-3, ischemia-reperfusion injury, transplantation.

Supervisor: prof. Ingrid Prkačin, PhD

Reviewers: prof. Mario Laganović, PhD, prof. Anita Škrtić, PhD, prof. Maja Matulić, PhD, prof. Inga Urlić, PhD.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	LITERATURNI PREGLED	5
2.1	Oblici akutnog oštećenja bubrega	5
2.2	Procjena funkcije bubrega.....	6
2.3	Histološka građa bubrega	10
2.4	Akutno ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje presatka bubrega.....	13
2.4.1	Stanične promjene tubula uslijed ishemije-reperfuzije	14
2.4.2	Posrednici upale	18
2.4.3	Odgođena funkcija bubrega	19
2.4.4	Regeneracija.....	19
2.5	Biopsije bubrega.....	20
2.6	Biomarkeri za detekciju akutnog oštećenja bubrega	21
2.7	Imunološki odgovor na presađak bubrega	22
2.7.1	Odbacivanje posredovano stanicama	23
2.7.2	Odbacivanje posredovano protutijelima.....	24
2.8	Molekula bubrežne ozljede-1	25
2.8.1	Struktura i smještaj molekule bubrežne ozljede	25
2.8.2	Funkcija molekule bubrežne ozljede-1	26
2.8.3	Ekspresija molekule bubrežne ozljede -1.....	27
2.9	Matriks metaloproteinaze.....	30
2.9.1	Definicija matriks metaloproteinaza.....	31
2.9.2	Struktura matriks metaloproteinaza	31
2.9.3	Podjela matriks metaloproteinaza prema strukturi i djelovanju	31
2.9.4	Funkcija matriks metaloproteinaza.....	32
2.9.5	Matriks metaloproteinaza-3	33
2.9.6	Matriks metaloproteinaze u bubregu	34
2.9.7	Regulacija matriks metaloproteinaza.....	36
3	MATERIJALI I METODE.....	37
3.1	Uzorci biopsija.....	37

3.2	Priprema uzoraka.....	38
3.2.1	Imunohistokemijsko bojenje	39
3.3	Analiza preparata	40
3.4	Gradacija vrijednosti kreatinina i glomerularne filtracije	43
3.5	Statističke metode	44
4	REZULTATI	45
4.1	Opis preparata	Error! Bookmark not defined.
5	RASPRAVA	85
6	ZAKLJUČAK.....	95
7	LITERATURA	97
8	ŽIVOTOPIS	111

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABMR- odbacivanje posredovano antitijelima (engl. *Antibody Mediated Rejection*)

ah- arterijska hijalinoza

ACR- akutno stanično odbacivanje (engl. *Acute Cellular Rejection*)

AKIN- engl. *Acute Kidney Injury Network*

AR- akutno odbacivanje (engl. *Acute Rejection*)

ATN- akutna tubularna nekroza

ATO- akutno tubularno oštećenje

ATP- adenozin trifosfat

BMI- indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Indeks*)

Bx- biopsija

CAN- kronična nefropatija presatka (engl. *Chronic allograft nephropathy*)

ci- kronične promjene intersticija

ct- kronične promjene tubula

DGF- odgođena funkcija presatka engl. *Delayed Graft Function*

ECM- izvanstanični matriks (engl. *Extracellular matrix*)

eGFR- procijenjena glomerulska filtracija (engl. *Estimated glomerular filtration rate*)

g-glomerulitis

v-intimalni vaskulitis

HAVCR-1- stanični receptor-1 virusa hepatitisa A

HE- hemalaun eozin

HLA- sistem leukocitnih antigena (engl. *Human leukocyte antigen*)

i- intersticijska upala

IF/TA- intersticijska fibroza i tubularna atrofija

Ig- imunoglobulin

IL-interleukin

KDIGO- engl. *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

MHC- glavni kompleks tkivne histokompatibilnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*)

KIM-1 molekula bubrežne ozljede-1 (engl. *Kidney Injury Molecule-1*)

MMP-3 matriks metaloproteinaza-3 (engl. *Matrix Metalloproteinase-3*)

NAD- nikotinamid adenin dinukleotid (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADPH- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NF-κB- pojačivač nuklearnog faktora kappa B (engl. *Nuclear Factor kappa-light chain-enhancer*)

OFP- odgođena funkcija presatka (engl. *Delayed Graft Function, DGF*)

RIFLE- engl. *Risk, Injury, Failure, Loss, End Stage Kidney Failure*

ROS- reaktivni kisikovi radikali (engl. *Reactive Oxygen Species*)

t-tubulitis

TCMR- odbacivanje posredovano stanicama (engl. *T cell mediated rejection*)

TGF- transformirajući faktor rasta (engl. *Transforming growth factor*)

TIMP- engl. *Tissue inhibitor of metalloproteinase*

TLR- receptor sličan Toll-u (engl. *Toll-like receptor*)

Tx- transplantacija

1 UVOD

Bubrezi filtriraju plazmu i iz filtrata uklanjaju otpadne tvari metabolizma, nadziru volumen i sastav tjelesnih tekućina. Svake minute bubrezi filtriraju oko 1,100 mL krvi u minuti. Bubrezi su hormonalno aktivni, luče hormone kao što su eritropoetin, renin, kalcitriol (1).

Akutno oštećenje bubrega (AOB) je naglo smanjenje bubrežne funkcije.

Uslijed smanjene glomerularne filtracije u krvi raste koncentracija završnih spojeva metabolizma dušika, ureje i kreatinina. Poremećena je regulacija elektrolita, acido-bazne ravnoteže i vode. Razvija se oligurija, stanje kada je volumen izlučenog urina manji od 400 ml u 24 sata.

Akutni poremećaj bubrežne funkcije može tijekom vremena dovesti do razvoja kronične bubrežne bolesti i posljedično do disfunkcije organa.

Bubreg je izrazito osjetljiv na nedovoljnu opskrbu kisikom. U parenhimu bubrega tijekom ishemije dolazi do propadanja funkcije nefrona zbog narušenih biokemijskih procesa koji osiguravaju nesmetano funkcioniranje stanica (1-4).

Postupak transplantacije bubrega je idealan model za proučavanje mehanizma akutnog bubrežnog oštećenja i oporavka. Tijekom transplantacije bubrega bitno je što kraće vrijeme ishemije presatka te brzi oporavak funkcije presatka bubrega što će direktno utjecati na njegovo dugoročno preživljenje. Prilikom transplantacije presadak bubrega je izložen ishemiji počevši od eksplantacije kada je prekinuta cirkulacija pa sve do trenutka ugradnje presatka bubrega i uspostave ponovnog protoka krvi kroz bubreg. Uspostavom protoka krvi u presatku bubrega aktivira se slijed događaja koji pogoršava bubrežnu funkciju, dolazi do akutnog ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja bubrega. Ishemija i reperfuzija (engl. *ischemia and reperfusion*, *I/R*) u bubrezima uzrokuje brojna oštećenja epitelnih stanica proksimalnih tubula te njihovu apoptozu i nekrozu.

Brojna istraživanja su pokazala da I/R u bubrezima inducira ekspresiju molekule bubrežne ozljede-1 (engl. *kidney injury molecule-1*, *KIM-1*) na razini mRNA i proteina. KIM-1 je glikoprotein eksprimiran na četkastoj membrani dediferenciranih epitelnih stanica proksimalnih tubula koje preuzimaju ulogu endogenih fagocita. Ima važnu ulogu u uklanjanju apoptotskih i nekrotičnih stanica koje su nastale uslijed I/R oštećenja. Tako su u epitelnim stanicama proksimalnih

kanalića, koje eksprimiraju protein KIM-1, identificirana apoptotska tjelešca. Drugim riječima, vežući se na apoptotske stanice preko imunoglobulinske-domene, epitelne stanice na kojima je eksprimirana KIM-1 preuzimaju ulogu endogenih fagocita. Pretpostavlja se da je posljedica fagocitoze apoptotskih stanica posredovanom KIM-1 stvaranje protu-upalnih citokina neophodnih za pravilan tijek imunološkog odgovora, te oporavak/homeostazu bubrežnog tkiva nakon I/R oštećenja (6, 7).

Ekspresija proteina KIM-1 nije uočena u normalnom bubrežnom tkivu te bi aberantna ekspresija KIM-1 mogla biti značajna u proučavanju mehanizma akutnog tubularnog oštećenja i regeneracije (8).

Nadalje, rezultati novijih istraživanja su ukazali na korelaciju između razine ekspresije proteina KIM-1 i znakova bubrežne funkcije; u bubrežima s većom ekspresijom proteina KIM-1 uočena je redukcija karbamida i kreatinina u serumu te porast glomerularne filtracije, tj. bolji oporavak funkcije bubrega tijekom vremena dok smanjena ekspresija proteina KIM-1 stoga može povećati učestalost kroničnog oštećenja bubrega (8).

Istraživanja su pokazala da reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*; ROS) potiču ekspresiju matriks metaloproteinaze-3 (engl. *matrix metalloproteinase 3*; MMP-3) u intersticiju bubrega. MMP-3 sudjeluje u procesu odvajanja ektodomene proteina KIM-1 s površine epitelnih stanica proksimalnih tubula i sudjeluje u razgradnji proteina izvanstaničnog matriksa. Istraživanja I/R oštećenja provedena na miševima pokazala su kolokalizaciju te povećanu ekspresiju proteina KIM-1 i MMP-3 u S3 segmentima proksimalnih tubula bubrega (9, 10).

Također, I/R oštećenje može dovesti i do intersticijske fibroze i tubularne atrofije (engl. *interstitial fibrosis and tubular atrophy*; IF/TA) koje uzrokuju smanjenje bubrežne funkcije te gubitak presatka bubrega. Nadalje, upala koja se javlja tijekom IF/TA uzrokuje lošije preživljenje bubrežnog presatka, iako se može nalaziti ispod praga za akutno odbacivanje prema Banff kriterijima (11).

Takav oblik akutnog odbacivanja, koje se javlja unutar prve godine nakon transplantacije karakterizira upalna infiltracija intersticija mononuklearnim stanicama bez vidljivog propadanja funkcije presatka (12).

Za dugoročno preživljenje bubrežnog presatka osobito je štetna slaba funkcija bubrega tijekom prvog tjedna nakon transplantacije, tzv. odgođena funkcija presatka (OFP) te zahtijeva uporabu dijalize unutar sedam dana od transplantacije (13).

Stoga, mehanizmi I/R oštećenja i regeneracije imaju važnu ulogu u očuvanju kvalitete i funkcije bubrežnog presatka. Kako tijekom transplantacije presađak bubrega prolazi I/R oštećenje, može nam poslužiti kao model za proučavanje mehanizma AOB i oporavka transplantiranog bubrega.

Povezanost ekspresije proteina KIM-1 i MMP- tijekom I/R oštećenja u bubrezima ljudi nije dovoljno istražena (9).

Naše istraživanje je provedeno na uzorcima protokolarnih i indikacijskih biopsija transplantiranih bubrega. Uzorci su pripremljeni i obojeni prema standardnim metodama pripreme histološkog preparata za dijagnostiku svjetlosnim mikroskopom. Kako bi se utvrdila ekspresija proteina KIM-1 i MMP-3 uzorci biopsija obojani su imunohistokemijskim metodama. Ukupna funkcija bubrega izražena je kao mjera vrijednosti serumskog kreatinina te procjenom glomerulske filtracije pomoću MDRD jednadžbe (engl. *modification of diet in renal disease; MDRD*).

Akutno odbacivanje bubrežnog presatka i kronične promjene analizirani su prema međunarodnim kriterijima Banff klasifikacije (11, 12).

Dobiveni podaci statistički su obrađeni pomoću neparametrijskih testova, Mann-Whitney U testa i korištenjem testa usporedbe parova po Durbin-Conoveru, a razina značajnosti postavljena je pri vrijednosti $p < 0,05$.

Ova disertacija pruža izvorni znanstveni doprinos u razumijevanju povezanosti ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3u transplantiranim bubrezima nakon I/R oštećenja. Dobiveni rezultati omogućit će bolje razumijevanje patofiziološke uloge proteina KIM-1 i MMP-3 u AKI te u oporavku tubula i cjelokupne funkcije ljudskih bubrega.

Budući se ekspresija KIM-1 značajno povećava nakon I/R oštećenja u odnosu na zanemarivo malu ekspresiju u bubrezima zdravih osoba, KIM-1 može poslužiti kao biomarker u proučavanju mehanizma AKI i regeneracije bubrega.

Hipoteza ovog istraživanja je da su ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 nakon akutnog ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja presatka bubrega povezane s oporavkom tubula i funkcijom bubrežnog presatka u prvoj godini nakon transplantacije. Pretpostavlja se da je ekspresija proteina KIM-1 u proksimalnim tubulima transplantiranih bubrega povezana s boljim oporavkom od akutnog tubularnog oštećenja, dok je povećana ekspresija proteina MMP-3 povezana s produženim oštećenjem.

Glavni cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 u uzorcima iglenih biopsija presađak bubrega nakon akutog ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja, tj. u odgođenoj funkciji presatka te u oporavku funkcije bubrega 12 mjeseci nakon transplantacije.

Ciljevi istraživanja za odrediti:

1. Odrediti ekspresiju proteina KIM-1 i MMP-3 u nultim biopsijama transplantiranih bubrega s akutnim tubularnim oštećenjem.
2. Promjenu ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 unutar 14 dana nakon transplantacije bubrega s akutnim tubularnim oštećenjem.
3. Odrediti ekspresiju proteina KIM-1 i MMP-3 u biopsiji transplantiranog bubrega prilikom epizode akutnog staničnog odbacivanja.
4. Odrediti prognostički značaj ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 nabubrežnu funkciju.

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Oblici akutnog oštećenja bubrega

Akutno oštećenje bubrega može biti prijobubrežno, bubrežno i postbubrežno. Prijobubrežno akutno oštećenje bubrega je reakcija na smanjeni protok krvi kroz bubrege. Najčešće se javlja uslijed popuštanja srčane funkcije i manjka izvanstanične tekućine. Prijobubrežni uzroci čine 50-80% akutnog oštećenja bubrega, reverzibilni su, osim u slučaju dugotrajne hipoperfuzije koja dovodi do ishemije tubula s razvojem ishemijske akutne tubularne nekroze i nemogućnosti oporavka bubrežne funkcije nakon ispravljanja hemodinamičkoga poremećaja. Ishemijske promjene najviše utječu na vanjski dio srži bubrega. Promjene karakteristične za akutno tubularno oštećenje su privlačenje upalnih stanica s i infiltracijom bubrežnog parenhima, intraglomerulska tromboza, opstrukcija lumena bubrežnih kanalića te produženi oporavak bubrežne funkcije.

Upalna reakcija je potaknuta stvaranjem citokina uslijed oksidativnog stresa i reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala (5, 14).

Bubrežno, intrinzično oštećenje zahvaća bubrežni parenhim, etiološki se dijeli na ishemijski ili nefrotoksični oblik. U 90% slučajeva radi se o akutnom tubularnom oštećenju uslijed smanjenja cirkulacije krvi kroz tkivo bubrega u patofiziološkim situacijama kao što su infekcije i septe.

Nefrotoksično akutno bubrežno oštećenje može biti i posljedica utjecaja tvari iz organizma (mioglobin, hemoglobin nakon traume, stanični sadržaj nakon raspada tumora, kristali uratne kiseline, oksalat ili kalcij), brojnih lijekova (npr. aminoglikozidni antibiotici, cisplatina, vankomicin), primjene kontrastnih sredstava u radiologiji, opojnih droga, biljnih i životinjskih toksina, teških metala i organskih otapala.

Intrinzično oštećenje bubrega može se podijeliti prema primarnom mjestu oštećenja bubrežnog parenhima: glomerula, tubula, intersticija ili krvnih žila.

Akutne upalne promjene poput glomerulonefritisa i intersticijskog nefritisa mogu progredirati u teško funkcijsko oštećenje bubrega (15, 16).

Postbubrežno oštećenje se javlja nakon opstrukcije kanalnog sustava bubrega. Najčešće je prisutna fizička blokada protoka urina. Sam tijek oštećenja i oporavak funkcije bubrega ovisi o vremenu u kojem će se otkloniti uzrok opstrukcije, najčešće je to kamenac unutar mokraćnog sustava. Osim kamenca, opstrukciju mogu uzrokovati tumor, gnojni sadržaj te krvni ugrušci. Oštećenje stanica tubula nastaje ubrzo nakon opstrukcije kanalnog sustava bubrega, raste intratubularni tlak koji uzrokuje dilataciju kanalnog sustava bubrega i atrofiju parenhima. U fazi kada se izjednače intratubularni tlak i tlak glomerularne filtracije sve manje se stvara urina jer se urinarni filtrat reapsorbira u intersticij i limfne žile bubrega (1-4, 17).

2.2 Procjena funkcije bubrega

Metode kojima procjenjujemo funkciju bubrega su određivanje koncentracije kreatinina u serumu, glomerulske filtracije i diureze. Vrijednosti serumskog kreatinina ne rastu dok nije izgubljeno više od 50% funkcionalnih glomerula, stoga je teško postaviti ranu dijagnozu akutnog oštećenja bubrega. Referentne vrijednosti koncentracije kreatinina u serumu su između 64 i 104 $\mu\text{mol/L}$.

Za procjenu stupnja akutnog oštećenja bubrega koriste se klasifikacije: RIFLE, AKIN i KDIGO (17).

Klasifikacija RIFLE (engl. *Risk, Injury, Failure, Loss, End stage renal disease*) dijeli akutno oštećenje bubrega prema porastu vrijednosti kreatinina jednako ili više od 50 % od osnovne vrijednosti i/ili pad glomerularne filtracije jednako ili više od 25 % i/ili smanjenje izlučene mokraće manje od 0.5 ml/kg tjelesne težine/h tijekom 6 ili više sati (Tablica 1.)

Tablica 1. Klasifikacija RIFLE* za akutno oštećenje bubrega.

* RIFLE: klasifikacija rizika, oštećenja, zatajenja i gubitka bubrega (engl. *Risk*,

	GF	Izlučivanje urina
Risk (rizik)	↑ kreatinin 1,5 x ili ↓ GF>25%	Urin < 0,5 mL/kg/h tijekom 6 sati
Injury (oštećenje)	↑ kreatinin do 2 x ili ↓ GF>25%	Urin < mL/kg /h tijekom 12 sati
Failure (zatajivanje)	↑ kreatinin do 3 x ili kreatinin>353,6 μmol/L ili ↓ GF>75%	Urin < 0.3 mL/kg /h tijekom 24 sata ili anurija tijekom 12 sati
Loss (gubitak)	Prezentno AOB, potpuni gubitak funkcije >4 tjedna	
ESRD (završni stadij KBB)	uremija	

**Injury*, *Failure*, *Loss*, *End stage renal disease*), GF - glomerulska filtracija; AOB - akutno oštećenje bubrega, ESRD (engl. *End Stage Renal Disease*), KBB, kronična bubrežna bolest;

mL/kg/h – mL / kg tjelesne težine / sat. Prilagođeno prema Kes P. I sur. (17.).

Klasifikacija AKIN (engl. *Acute Kidney Injury Network*) modificirana je verzija klasifikacije RIFLE akutnog oštećenja bubrega (Tablica 2).

Tablica 2. Klasifikacija AKIN za akutno oštećenje bubrega

Stadij AOB-a	Kreatinin u serumu	Izlučivanje urina
1.	Apsolutno povećanje $\geq 26,5$ μmol/L ili kreatinin 1,5-2x od osnovne vrijednosti	< 0,5 ml/kg tjelesne težine/h tijekom > 6 sati
2.	kreatinin 2-3 x od osnovne vrijednosti	< 0,5 ml/kg tjelesne težine/h tijekom > 12 sati
3.	kreatinin ≥ 3 x od osnovne vrijednosti ili kreatinin $\geq 353,6$ μmol/L s apsolutnim povećanjem za $\geq 44,2$ μmol/L ili nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom	< 0,5 ml/kg tjelesne težine/h tijekom > 24 sata ili anurija tijekom 12 sati

* Klasifikacija AKIN (engl. *Acute Kidney Injury Network*), AOB - akutno oštećenje bubrega, * mL/kg/h – mL / kg tjelesne težine / sat; prilagođeno prema Kes P. I sur. (17.).

Klasifikacija po KDIGO-u (engl. *Kidney Disease Improving Global Outcomes*) modificirana je verzija koja objedinjuje obje prethodne klasifikacije RIFLE i AKIN (Tablica 3).

Prema klasifikaciji KDIGO razlikuju se tri stadija akutnog oštećenja bubrega.

Stadij 1 karakterizira porast serumske koncentracije kreatinina za 1,5 do 1,9 puta od početne vrijednosti koja je jednaka ili viša od 26,5 $\mu\text{mol/L}$, uz izlučivanje mokraće manje od 0,5 ml/kg tjelesne težine/h tijekom 6 do 12 sati.

U stadiju 2 porast koncentracije kreatinina iznosi 2,0 do 2,9 puta više od početne vrijednosti uz izlučivanje mokraće manje od 0,5 ml/kg tjelesne težine/h tijekom više od 12 sati.

U stadiju 3 koncentracija kreatinina je 3,0 puta veća od početne vrijednosti, odnosno iznosi jednako ili više od 353,6 $\mu\text{mol/L}$, uz izlučivanje mokraće manje od 0,3 ml/kg tjelesne težine/h tijekom više od 24 sata ili anurija (17-19).

Tablica 3. Klasifikacija KDIGO za akutno oštećenje bubrega

Stadij AOB-a	Kreatinin u serumu	Izlučivanje urina
1.	Porast kreatinina za $\geq 26,5 \mu\text{mol/L}$ unutar 48 sati ili porast kreatinina od osnovne vrijednosti za 1,5-1,9 x unutar 7 dana	$< 0,5 \text{ ml/kg tjelesne težine/sat}$ tijekom > 8 sati
2.	Porast kreatinina od osnovne vrijednosti za 2,0-2,9 x unutar 7 dana	$< 0,5 \text{ ml/kg/sat}$ tijekom > 16 sati
3.	Porast kreatinina od osnovne vrijednosti za više od 3 x unutar 7 dana ili nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom	$< 0,3 \text{ ml/kg/sat}$ tijekom 24 sata ili anurija tijekom 12 sati

* KDIGO (engl. *Kidney Disease Improving Global Outcomes*), AOB - akutno oštećenje bubrega, mL/kg/h – mL / kg tjelesne težine / sat; prilagođeno prema Kes P. I sur. (17.).

Procjena glomerularne filtracije (engl. *Estimated Glomerular Filtration Rate*, eGFR) je procjena volumena krvi koji protječe u minuti kroz krvne žile glomerula u površini 1,73 m^2 , a izračunava se s pomoću jednadžbe za MDRD (engl. *Modification of Diet in Renal Disease*). Jednadžba se temelji na umnošku koncentracije serumskog kreatinina i varijabli dob, spol i rasa.

$\text{eGFR (ml/min/1,73 m}^2\text{)} = 175 \times [\text{kreatinin u serumu (mg/dL)}]^{-1,154} \times [\text{dob}]^{-0,203} \times (1,212 \text{ afroamerikanci}) \times (0,742 \text{ ženski spol})$ (17).

Pri akutnom oštećenju bubrega upotreba jednadžbe MDRD može dovesti do pogreške u procjeni funkcije bubrega jer se radi o akutnom zbivanju u vrlo kratkom vremenu nedovoljno da bi došlo do povećanja koncentracije kreatinina u serumu a koja se može odrediti laboratorijskim testovima (17).

U početnoj fazi oporavka funkcije bubrega prvo se uspostavlja glomerulska filtracija, a tek kasnije funkcija tubula. Tijekom praćenja oporavka funkcije bubrega svakodnevno se mjeri koncentracija kreatinina u serumu, iako taj test ima nisku osjetljivost i specifičnost u procjeni oporavka funkcije bubrega.

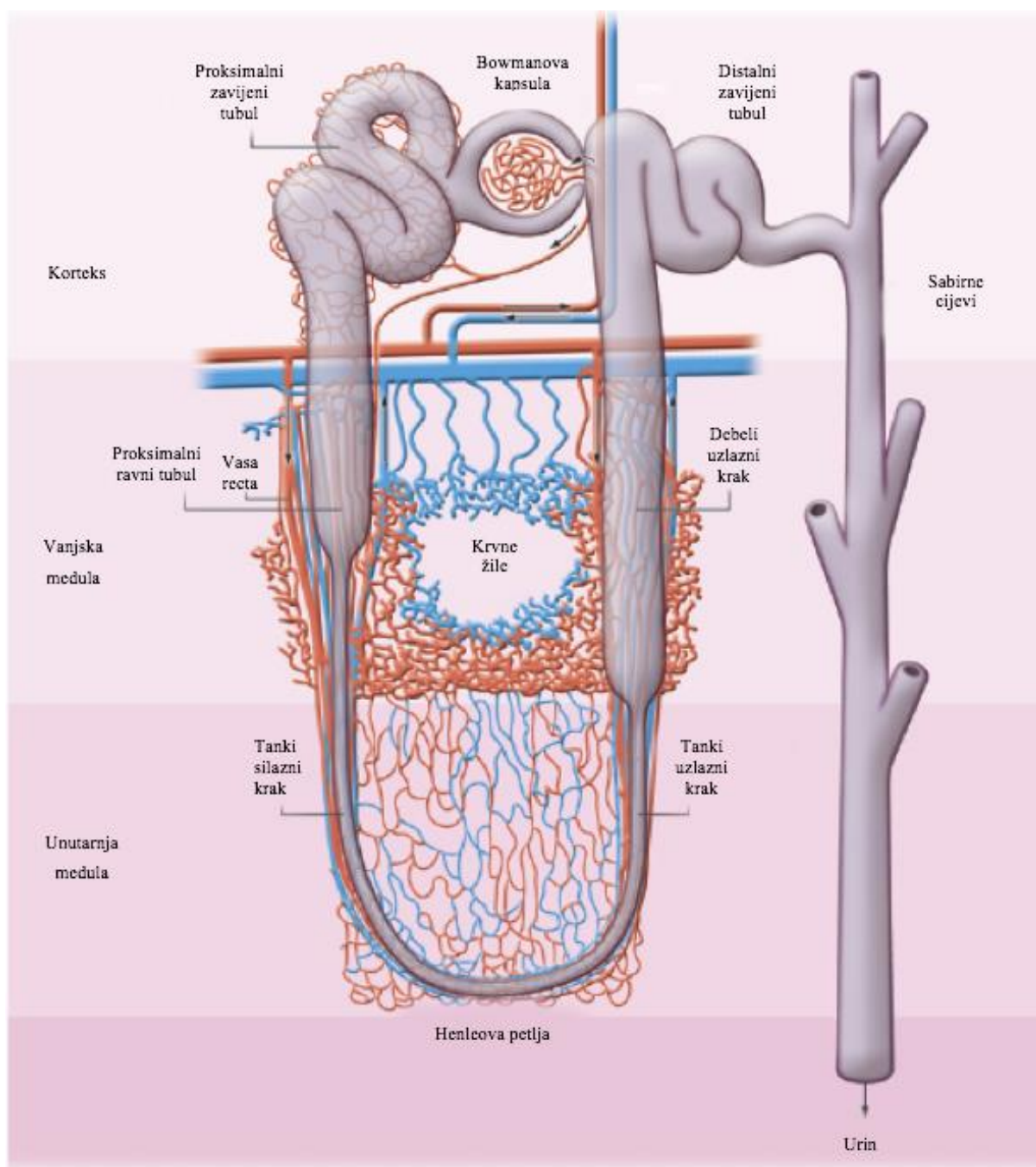
Većina biomarkera, kao i molekula bubrežne ozljede-1, pokazali su se korisnima samo ako je bilo poznato vrijeme oštećenja i etiologija glomerularne filtracije. Većina biomarkera nije specifična za pojedini oblik akutnog oštećenja bubrega (AOB). Nastoji se pronaći dijagnostički osjetljiv i specifičan biomarker koji će pouzdano identificirati AOB.

Kako bi se izbjeglo teže oštećenje parenhima i razvoj kronične bubrežne bolesti te postigao što brži oporavak funkcije bubrega potrebna je rana detekcija akutnog oštećenja bubrega. Ključnu ulogu u tome imaju biomarkeri bubrežne ozljede (14). Problem AOB-a je što se radi o kliničkom sindromu koji je posljedica niza drugih sindroma poput kardioresalnog, hepatoresalnog, nefrotoksičnog i septičnog sindroma kao i akutnog intersticijskog nefritisa te ne postoji jedan biomarker za detekciju AOB-a, odnosno niti jedan biomarker se do sada nije pokazao dovoljno osjetljiv za cijeli spektar uzroka AOB-a (20).

2.3 Histološka građa bubrega

Bubreg je paran organ, okružen vezivnom kapsulom. Sastoji od kore (lat. *cortex renalis*) debljine oko jedan centimetar te srži (lat. *medulla renalis*) koju čine 8 do 18 piramida bubrega. Kora bubrega smještena je periferno, supkapsularno, te se proteže između piramida medule prema hilusu bubrega (21).

Osnovna funkcionalna jedinica bubrega je nefron. Svaki bubreg sadrži od 1 do 4 milijuna nefrona. Nefron je struktura koju čine: glomerul (bubrežno tjelešce), iz kojeg izlazi sekretorni proksimalni zavijeni tubul, nastavlja se u dio nazvan Henleova petlja, koja je građena od silaznog i uzlaznog kraka te se nakon toga nastavlja u distalni zavijeni tubul koji se nastavlja na sabirne tubule sa završetkom u bubrežnim vrčevima koji se spajaju u bubrežnu nakapnicu (2), (Slika 1).



Slika 1. Građa nefrona. Označena je građa nefrona po segmentima uz smještaj po regijama bubrežnog parenhima uz krvne žile vanjske medule (preuzeto i prilagođeno prema Bonventre i sur. 2013. (2)).

Glomerul ili bubrežno tjelešće građeno je od klupka krvnih kapilara, kojeg obavlja glomerularna (Bowmanova) kapsula. Bazalna membrana kapilara nalazi se između fenestriranih endotelne stanice glomerula, koje se nalaze s unutarnje strane membrane, podocita, epitelne stanice koje se nalaze s vanjske strane membrane. Glomerularna filtracijska barijera uključuje tri sloja: epitelne stanice glomerula, bazalnu membranu i fenestrirane endotelne stanice; te predstavlja posljednju barijeru prolasku proteina u urinarni filtrat (21).

Funkcionalno sekretorni tubul počinje u glomerulu kao proksimalni zavijeni tubul, a građen je od jednoslojnog kubičnog ili cilindričnog epitela koji na svojoj apikalnoj površini ima četkastu membranu od brojnih mikrovila. Na bazalnim i lateralnim dijelovima stanične membrane smještene su brojne Na/ K- ATPaze pumpe važne za aktivni prijenos natrija kroz membrane stanica (21).

Epitelne stanice tubula imaju obilnu citoplazmu i brojne mitohondrije. Na staničnoj površini prisutni su mikrovili koji tvore četkastu membranu karakterističnu za tubule. Mikrovili povećavaju funkcionalnu površinu membrane stanice prilikom apsorpcije i sekrecije tvari (17, 22).

Proksimalni zavijeni tubul nastavlja se u dio nazvan Henleova petlja, koja je građena od silaznog debelog kraka, tankog zavijenog segmenta i debelog uzlaznog kraka te se nakon toga nastavlja u distalni zavijeni tubul.

Distalni zavijeni tubul građen je od jednoslojnog kubičnog epitela, a razlikuje se od proksimalnog zavijenog kanalića po tome što te tubularne stanice na svojim apikalnim površinama nemaju četkastu membranu od mikrovila. Distalni zavijeni kanalić u jednom dijelu priliježe uz dovodnu arteriolu glomerula. To područje naziva se *macula densa*, a sadrži stanice koje su osjetljive na koncentraciju iona u plazmi i volumen vode u kanalićima čime je regulirano otpuštanje renina u krvotok. Stanice *macule dense* i dovodne arteriole čine jukstaglomerularni aparat (21).

Između kanalića u parenhimu bubrega nalazi se intersticij, a koji čini oko 8% bubrežnog parenhima. Intersticij je građen od vezivog tkiva kojeg čine fibroblasti i kolagena vlakna. Osim vezivnog tkiva, u intersticiju su smještene male krvne žile čije endotelne stanice sintetiziraju prostaglandine i prostacikline te endokrine stanice koje sudjeluju u sintezi renina i eritropoetina; što sve utječe na protok krvi kroz bubrežni parenhim (1, 21).

2.4 Akutno ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje presatka bubrega

Postupak transplantacije bubrega je idealan model za proučavanje mehanizma akutnog bubrežnog oštećenja i njegovog oporavka. Presadak bubrega tijekom postupka transplantacije prolazi kroz ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje koje je jedno od čimbenika akutnog oštećenja tubula (1, 23-25).

Dugotrajna nedovoljna opskrba tkiva bubrega kisikom uzrokuje oštećenje epitelnih stanica tubula, zbog toga disfunkcija bubrega traje i nakon uklanjanja hemodinamskog poremećaja.

U početnoj, ishemijskoj fazi, smanjuje se protok krvi kroz bubreg na minimum te se uslijed nedostatka kisika i hranjivih tvari mijenja unutarstanična koncentracija iona, potrošen je stanični adenzin-trifosfat (ATP), posljedično se stvaraju slobodni kisikovi radikali (2, 17, 23-26).

Vazokonstrikcija krvnih žila unutar bubrega uzrokuje smanjenje protoka i raspodjelu krvi u bubrežnom parenhimu ponajviše u vanjskom dijelu bubrežne srži. Oštećene epitelne stanice tubula privlače upalne stanice koje infiltriraju okolno tkivo, uzrokujući lokalno oštećenje oslobađanjem slobodnih kisikovih radikala, proteaza i daljnjom proizvodnjom upalnih citokina. Povećava se koncentracija raznih citokina i kemokina koji imaju značajnu ulogu u upali. Međudjelovanje leukocita i endotela uzrokuje dilataciju krvožilne mreže s posljedičnom kongestijom bubrežne srži što dodatno smanjuje regionalni protok krvi u srži bubrega. Oštećene epitelne stanice mogu začepiti lumen tubula na dva osnovna načina, povećanjem volumena stanice bubrenjem i vakuolizacijom, ili se mogu odljuštiti u lumen, a što uzrokuje vraćanje filtrata prema glomerulu i porast tlaka unutar tubula. Za oporavak funkcije epitelnih stanica i strukture tubula potrebno je ukloniti odljušteni stanični detritus u lumenu da bi se osigurala nesmetana protočnost urinarnog filtrata kroz tubule (17, 27).

Slijedi stadij pogoršanja funkcije bubrega u kojem, tijekom maksimalno trajanja tri dana, perzistiraju ishemija tkiva i primarni upalni odgovor. Upalni odgovor na

oštećenje endotelnih stanica malih krvnih žila i vrijeme trajanja ishemije ne pružaju brzi oporavak nakon vraćanja protoka krvi kroz bubreg.

Zbog nekroze i apoptoze dolazi do oštećenja i smrti stanica. Stanice bubrežnog epitela rijetko podliježu čistoj nekrozi i uglavnom se radi o reverzibilnim oštećenjima epitelnih stanica tubula.

U fazi održavanja koja traje od 3. do 8. dana od početka ishemijskog oštećenja, postupno se oporavljaju stanice tubula, prisutan je oporavak i proliferacija stanica endotela i epitela tubula. Uspostavlja se prijašnja struktura i funkcija stanica, krvotok se normalizira no perzistira slaba funkcija bubrega unatoč prestanku ishemije.

Oko osmog dana od početka ishemije slijedi faza oporavka funkcije bubrega. U ovoj fazi može doći do naglog povećanja izlučenog urina jer stanice tubula nisu u stanju održavati homeostazu soli i vode (17, 27).

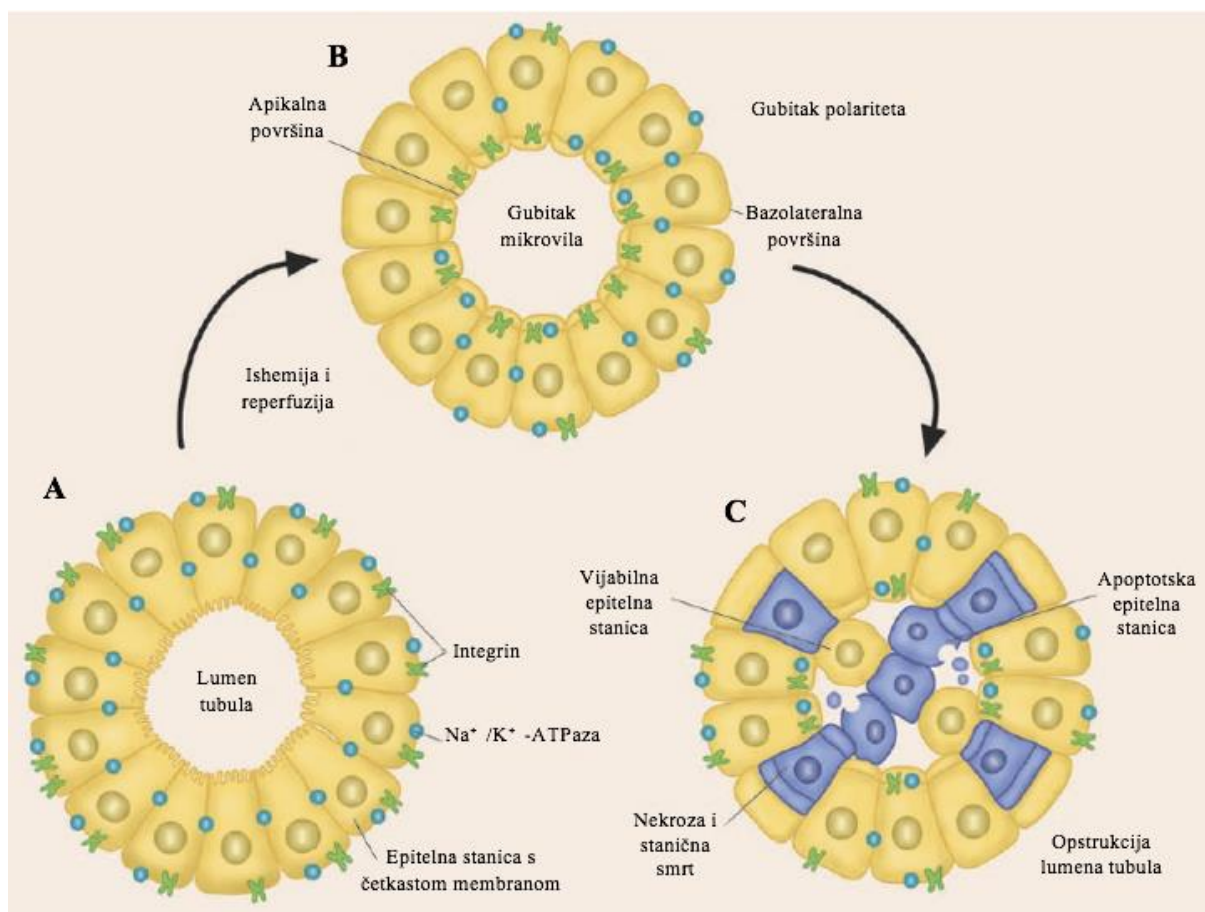
2.4.1 Stanične promjene tubula uslijed ishemije-reperfuzije

Najčešći uzrok unutarbubrežnog zatajenja funkcije je ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje. U unutarbubrežnom zatajenju funkcije uzrokovanom hipoperfuzijom, prisutno je strukturalno tubularno oštećenje koje izostaje kod prijebubrežnog zatajenja funkcije bubrega.

Ishemijsko oštećenje bubrega najizraženije je u S3 segmentu proksimalnog tubula. U proksimalnim tubulima uslijed ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja dolazi do poremećaja uskih međustaničnih spojeva, promjene polariteta epitelnih stanica, gubitka četkaste površine, promjene položaja integrina i Na^+/K^+ -ATPazne pumpe na površini epitelnih stanica te dilatacije lumena tubula.

Ishemija smanjuje stanični ATP, a posljedično se inaktivira Na^+/K^+ -ATPaza. Uslijed prestanka aktivnosti Na^+/K^+ -ATPazne pumpe raste razina natrija u citoplazmi stanice i javlja se stanični edem, a nakupljanjem kalcija u mitohondrijima pospješuje se stvaranje slobodnih kisikovih radikala (eng. Reactive Oxygen Species, ROS). U lumenu proksimalnih tubula formiraju se cilindri odljuštenih epitelnih stanica, neutrofilnih granulocita i filtriranih, precipitiranih bjelančevina u lumenu koji se nazivaju zrnati proteinski cilindri. Takvi cilindri uzrokuju opstrukciju i dilataciju tubula te dolazi do redukcije glomerularne

filtracije. Jedna od značajnijih morfoloških promjena u intrinzičnom oštećenju je upravo dilatacija lumena tubula. Epitelne stanice koje su nađene u lumenu tubula mogu se ponovno pričvrstiti na bazalnu membranu tubula i rediferencirati (2, 4, 24, 28, 29) (Slika 2).



Slika 2. Uslijed ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja javljaju se morfološke promjene u proksimalnim tubulima: gubitak polariteta, gubitak četkaste membrane, premještanje integrina i Na⁺/K⁺-ATPaze na apikalnu površinu epitelnih stanica proksimalnih tubula. Vijabilne i nevijabilne stanice odvajaju se u lumen tubula te njihovo nakupljanje u cilindre uzrokuje opstrukciju lumena i smanjenje glomerularne filtracije (preuzeto i prilagođeno prema Schrier i sur. 2004. (24)).

Ishemijsko akutno oštećenje proksimalnih tubula može se uočiti patohistološkom analizom protokolarnih biopsija presatka bubrega nakon transplantacije (4, 30).

Prisutnost cilindara i epitelnih stanica tubula u urinu potvrđuje tubularno stanično oštećenje i smrt stanica apoptozom i/ili nekrozom (2).

Zbog ishemije mijenja se organizacija citoskeleta endotelnih stanica arteriola, prekida se integritet endotelnih međustaničnih uskih spojeva peritubularnih kapilara, dolazi do funkcionalnog poremećaja barijere endotelnih stanica i povećane vaskularne permeabilnosti (31-33). Uspostavom ponovnog protoka krvi, reperfuzijom, u presatku bubrega aktivira se slijed događaja koji pogoršava bubrežnu funkciju. Uslijed naglog porasta razine kisika u parenhimu bubrega stvaraju se velike količine slobodnih kisikovih radikalau mitohondrijima epitelnih stanica a koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju i karbonilaciju proteina. Rezultat je oštećenje mitohondrija s daljnjim otpuštanjem slobodnih radikala i aktivacije apoptotskog puta s posljedičnim propadanjem epitelnih stanica tubula (34, 35).

Ishemija uzrokuje intersticijsku upalu i oštećenje malih krvnih žila koju karakterizira bubrenje endotelnih stanica s posljedičnom okluzijom malih krvnih žila te dolazi do izostanka ponovnog protoka krvi, pojava fenomena „*no-reflow*“. Redukcija krvotoka tijekom reperfuzije pogoršava hipoksiju i doprinosi opsežnoj staničnoj smrti epitelnih stanica tubula dominantno u području vanjskog dijela srži bubrega (29, 32, 36).

Glavnu ulogu u patofiziologiji akutnog oštećenja bubrega imaju endotelne stanice i glatke mišićne stanice mikrocirkulacijskog sustava. Endotelne stanice doprinose patologiji ishemijskog AOB. Pojačana interakcija između endotelnih stanica i leukocita u cirkulaciji je posljedica pojačane ekspresije adhezivnih molekula na endotelnim stanicama kao što su VCAM-1, ICAM-1 i E-selektini na oštećenim endotelnim stanicama i pojačana ekspresija L-selektina na leukocitima. Aktiviraju se leukociti, dolazi do opstrukcije kapilara i venula, transmigracija leukocita, stvaranje citokina i ubrzano proupalno stanje (2).

Ishemija i reperfuzija dovode do aktivacije programirane stanične smrti, apoptoze (nuklearna fragmentacija, bubrenje plazmatske membrane, skupljanja stanice i gubitak potencijala i integriteta mitohondrijske membrane), autofagijom povezane stanične smrti (citoplazmatska vakuolizacija, gubitak organela i akumulacija vakuola s membranskim vretenima) i nekroza (progresivno bubrenje stanice i

organela, ruptura plazmatske membrane i curenje lizosomskih enzima u izvanstanični prostor) (17, 26).

Oppong i suradnici (25) su analizirali utjecaj akutnog oštećenja tubula tijekom reperfuzije na ishod funkcije bubrega. Analizirali su akutne promjene tubula prema novom, standardiziranom sistemu. Prema njihovim saznanjima, akutno oštećenje tubula ne korelira s odgođenom funkcijom presatka, akutnim odbacivanjem, niti s preživljenjem presatka. Suprotno tome, umjereno do teško kronično oštećenje parenhima povezano je sa smanjenom glomerularnom filtracijom 5 godina nakon transplantacije (25).

Kronična hipoksija uslijed oštećenja endotelnih stanica može utjecati na kontinuirano oštećenje tubularnog epitela i razvoju tubulointersticijske fibroze (31, 32, 37).

Akutna tubularna nekroza (engl. *Acute Tubular Necrosis, ATN*) je pojam koji se često navodi u studijama bez jasno definiranog sustava stupnjevanja oštećenja, a, glavni uzročnici su ishemija i nefrotoksični agensi. Uključuje i intrinzični uzrok disfunkcije organa koji često ne korelira s histološkim strukturalnim promjenama bubrežnog parenhima. (25, 38).

Akutne i kronične promjene bubrega analizirane su prema kriterijima iz Banff klasifikacije (39-41).

Nekrotične stanice izrazito su imunostimulatorne i dovode do infiltracije upalnih stanica i stvaranja citokina. Ovaj sterilni imuni odgovor uključuje signalne događaje kroz molekule koje prepoznaju uzorke, kao što su TLR (engl. *Toll Like Receptor*), pokretanje i aktivacija imunih stanica urođenog i stečenog imunog sustava i aktivaciju sistema komplementa (31).

2.4.2 Posrednici upale

Neutrofilni leukociti (neutrofili) se javljaju u akutnoj upali, transmigracijom prolaze kroz stijenku krvne žile i nastavljaju kretanje usmjereno kemotaktičnim tvarima kroz međustanične prostore, prema mjestu upale. Infiltracija neutrofila značajno je povezana s dugotrajnom hladnom ishemijom i s odgođenom funkcijom presatka. Životni vijek im je genski programiran i iznosi dva do četiri dana.

Povišene koncentracije serumskog kreatinina 3 do 6 mjeseci nakon transplantacije također su povezane s prisutnošću neutrofila i trombocita u bubrežnom parenhimu nakon reperfuzije. Slobodni kisikovi radikali oštećuju tkiva peroksidacijom lipida i aktivacijom endotelnih stanica. Dolazi do funkcionalnog i strukturalnog staničnog oštećenja (42).

Neutrofili se smatraju primarnim medijatorima ozljede čija aktivacija vodi u otpuštanje slobodnih kisikovih radikala, raznih proteaza i dovodi do ozljede bubrežnog tkiva. Po aktivaciji makrofagi otpuštaju proteolitičke enzime i proupalne citokine. Imunološki odgovor posredovan s TLR 4 povezan je i s bubrežnom fibrozom.

Makrofagi su u bubregu smješteni u tubularnom intersticiju i mezangiju glomerula. Osnovna uloga makrofaga je čišćenje intersticijskog okoliša od staničnog detritusa. Makrofagi se javljaju u bubregu unutar 30 minuta od reperfuzije, vrhunac infiltracije neutrofila i makrofaga je tijekom 24-48 sati i povišene vrijednosti traju sve do minimalno šestog dana nakon reperfuzijskog oštećenja. Uklanjaju stanični detritus i apoptotske stanice, sudjeluju u smanjenju ozljede i potiču obnovu tkiva. Nakon fagocitiranja nekrotičnih ostataka dolazi do promjene u ekspresiji površinskih proteina te produkcije citokina i proupalnih čimbenika (43-45).

Makrofagi i dendritične stanice imaju važnu ulogu u urođenom i stečenom imunom odgovoru na akutno ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje, izražavaju veliki broj staničnih površinskih proteina poput proupalnih citokina kao što su interleukini: IL-1a, IL-6, IL-12 i faktor tumorske nekroze-alfa (45).

Mosser i suradnici u svojoj studiji proučavali sufunkciju makrofaga u ishemijsko-reperfuzijskom modelu oštećenja bubrega te su pokazali daaktivacija makrofaga

korelira s popravkom oštećenog parenhima bubrega a ne sa samim oštećenjem parenhima (44).

Infiltracija makrofaga i lokalna proliferacija korelira s težinom oštećenja glomerula i tubulo-intersticija (46).

Rezultati studije Sang-Kyung Jo pokazali su da makrofagi imaju važnu ulogu u ishemijsko-reperfuzijskom oštećenju. Makrofagi sudjeluju u bubrežnom oštećenju stvaranjem brojnih proupalnih citokina: interleukin-6, faktor tumorske nekroze- α , interleukin-1 β , i interferon- γ , te proteolitičkih enzima koji oštećuju tkivo (47).

2.4.3 Odgođena funkcija presatka bubrega

Odgođena funkcija presatka je specifični oblik akutnog oštećenja transplantiranog bubrega. Prisutan je spori oporavak funkcije presatka bubrega u prvih desetak dana od transplantacije. Funkcija bubrega mjeri se vrijednostima kreatinina u serumu, procjenom glomerularne funkcije i diurezom. Sporiji strukturalni i funkcionalni oporavak presatka bubrega nakon transplantacije posljedica je teže ishemijsko-reperfuzijske ozljede i trajanja OFP. Smatra se da produženi oporavak funkcije presatka negativno utječe na njegovo dugoročno preživljenje. Prema rezultatima studije Castro Filho i sur. patohistološkom analizom biopsija presadaka bubrega koji imaju i odgođenu funkciju i akutno odbacivanje, najčešće je prisutno akutno oštećenje tubula, a zatim po pojavnosti slijede akutno odbacivanje i granično odbacivanje. Takvi presatci imaju 5-godišnju stopu preživljenja 34%, prema podacima za Sjedinjene Američke Države (13, 48-54).

2.4.4 Regeneracija

Nakon akutnog oštećenja, epitel tubula bubrega obnavlja se s preživjelim intrinzičnim epitelnim stanicama. Dediferencirane progenitorne stanice naseljavaju oštećena ogoljela mjesta tubula i time obnavljaju strukturu i funkciju tubula (55-56). Rezultati istraživanja koje su proveli Humphreys i sur. (57) ukazuju da su nakon akutnog oštećenja uočene nove epitelne stanice stvorene diobom preživjelih koje zamjenjuju oštećene i nekrotične stanice.

2.5 Biopsije bubrega

Prema kriterijima iz Banff klasifikacije iglena biopsija tkiva bubrega mora imati najmanje sedam glomerula i jednu arteriju, odnosno optimalno deset glomerula i dvije arterije.

Nulte biopsije bubrežnog presatka su biopsije koje se provode tijekom same transplantacije bubrega, bilo prije, ili nakon uspostave protoka u presatku bubrega. Svrha nultih biopsija je utvrđivanje početnog histološkog stanja presatka, može se utvrditi porijeklo lezije, da li je lezija novonastala ili je prenijeta od darivatelja, kako bi se kod idućih kronološki poredanih protokolarnih biopsija mogao usporediti histološki nalaz bubrega te procijeniti funkcija presatka, utvrditi stupanj regeneracije tubula te predvidjeti ishod, preživljenje presatka bubrega (58-62).

Primjer korisnosti uzimanja protokolarnih biopsija je nalaz graničnog odbacivanja, a kao što su uočili Wilkinson i suradnici u svojoj studiji, tes su zaključili da polovica epizoda odbacivanja može biti bez funkcionalnih znakova oštećenja, te može proći nezapaženo. Protokolarne biopsije su korisne i u procjenjivanju kroničnih promjena koje mogu utjecati na funkciju i preživljenje presatka (59-62).

Patohistološka analiza biopsije bubrega ima važnu ulogu u dijagnozi odbacivanja i ispravnom liječenju u indikacijkoj biopsiji presatka koja se uzorkuje zbog funkcionalnih znakova oštećenja, pogotovo ako je uzorkovanje pravovremeno. (63, 64).

Indikacije za biopsiju bubrega uključuju kontinuirano povišene vrijednosti kreatinina u serumu, smanjenje eGFR i oliguriju (65-67).

U ranom poslije-transplantacijskom razdoblju indikacijska biopsija presatka potrebna je kako bi se mogli definirati uzroci akutnog oštećenja bubrega, radi li se samo o OFP , ili je prisutno akutno odbacivanje (12, 16).

U postupku transplantacije bubrega bitno je što kraće vrijeme ishemije te brzi oporavak funkcije presatka bubrega jer isti uvjetuju njegovo dugoročno preživljenje (2, 4).

Prema ovome, akutno oštećenje bubrega je česta komplikacija u svim fazama transplantacije i razdoblju nakon transplantacije te je prisutan veliki rizik za odgođenu funkciju bubrega, sve do propadanja funkcije i gubitka presatka bubrega.

Stoga je velika potreba za ranim, pouzdanim i učinkovitim biološkim markerima akutnog oštećenja bubrega (38).

Idealan marker trebao bi biti neinvazivan, lako mjerljiv u uzorcima krvi i urina, pouzdan, visoko osjetljiv i specifičan za AOB. Trebao bi predvidjeti stupanj oštećenja i ujedno brzinu oporavka funkcije presatka bubrega, no da li takav marker postoji (14)?

2.6 Biomarkeri za detekciju akutnog oštećenja bubrega

De Oliveira i suradnici navode u preglednom članku iz 2019. godine problematiku mjerenja vrijednosti kreatinina u serumu (engl. *Serum Creatinine*, SCr) kao markera za akutno oštećenje bubrega. Povišene razine kreatinina mogu se javiti u ishemijskim ozljedama, no isto tako i u toksičnim ozljedama, opstruktivnim promjenama i u kroničnim bolestima bubrega. Također u literaturi je zamijećena značajnija povezanost vremenskog trajanja povišenih vrijednosti serumskog kreatinina s morbiditetom i mortalitetom nego sam porast kreatinina. Iz svega navedenog može se zaključiti da vrijednost kreatinina u serumu nije specifični marker za akutno oštećenje tubula (16, 68).

Do sada su proučavani biomarkeri u urinu i serumu za akutno oštećenje tubula: molekula bubrežne ozljede-1 (engl. *Kidney Injury Molecule-1*), neutrofilni lipokalin vezan uz gelatinazu (engl. *Neutrophil-gelatinase-associated lipocalin*, NGAL), cistatin C, interleukin-18 (IL-18), jetreni tip proteina koji veže masne kiseline (engl. *Liver-type fatty acid-binding protein*, L-FABP), inzulinu sličan faktor rasta vežući protein (engl. *Insulin like growth factor-binding protein 7*, IGBP7), tkivni inhibitor metaloproteinaze-2 (engl. *Tissue inhibitor of metalloproteinases-2*, TIMP-2), kalprotektin, urinarni angiotenzinogen i mnogi drugi čiji se broj stalno povećava (15, 69, 70).

2.7 Imunološki odgovor na presadak bubrega

Imunost je podijeljena na urođenu i stečenu. Urođena imunost predstavlja prvu liniju obrane protiv patogena, nije specifična, čine ju fizičke barijere (koža, sluznica) i stanice upalnog odgovora. Reakcije na antigene su nespecifične. Sudjeluje u aktivaciji stečenog imunog odgovora (71-74).

Stečena imunost je specifična, nakon senzibilizacije na određeni antigen. Imunološkom memorijom u ponovnom susretu dolazi do reakcije sa specifičnim antigenom (64, 65, 72).

Antigeni u presatku bubrega poznati su kao glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex, MHC*). Kod ljudi je ova skupina površinskih staničnih proteina poznata kao humani leukocitni antigen (HLA, engl. *Human Leukocyte Antigen*) kodirani su na kratkom kraku kromosoma 6, a glavna uloga im je prezentacija antigena T limfocitima.

Reakcija odbacivanja presatka bubrega je imunološka reakcija primatelja usmjerena prema molekulama HLA i ostalim antigenima izraženima na površini stanica stranog transplantiranog organa. Prisutna su dva mehanizma imunološkog odgovora: stanični i humoralni. T-limfociti imaju glavnu ulogu u staničnom obliku odbacivanja presatka, dok je humoralni odgovor posredovan protutijelima (63, 64). Prema brzini nastanka reakciju odbacivanja možemo podijeliti na hiperakutnu, akutnu i kroničnu.

Hiperakutno odbacivanje presatka bubrega događa se iznimno brzo, unutar prva 24 sata od transplantacije. Patohistološki su karakteristične tromboze velikih krvnih žila u presatku i krvarenja u okolno tkivo. Hiperakutno odbacivanje je uzrokovano humoralnim odbacivanjem, prethodno postojećim protutijelima domaćina koja se vežu na antigene u endotelu presatka (67, 75, 76).

Akutna reakcija odbacivanja posredovana protutijelima, humoralno odbacivanje, događa se većinom u prva tri tjedna nakon transplantacije, dok se akutna reakcija posredovana stanicama najčešće događa u prva tri mjeseca.

Kronično odbacivanje presatka bubrega javlja se nakon nekoliko mjeseci ili čak nekoliko godina nakon transplantacije. Može biti posredovano protutijelima ili stanicama.

Smatra se da je kronično odbacivanje posljedica kontinuiranih epizoda akutnog odbacivanja uz pridružene neimunološke kronične čimbenike, što rezultira fibrozom, propadanjem funkcije i krajnje gubitnom presatka (64, 67, 75).

2.7.1 Odbacivanje posredovano stanicama

Akutno stanično odbacivanje (engl. *Acute Cellular Rejection, ACR*) je najčešći tip odbacivanja, može se javiti sedam dana do tri mjeseca nakon transplantacije. T-limfociti, senzibilizirani pomoćnički CD4⁺ T limfociti i citotoksični CD8⁺ T limfociti infiltriraju presadak bubrega, prepoznaju antigene HLA darivatelja, koje im predaju dendritične stanice. Reakcija se odvija na površini endotelnih stanica krvnih žila te na površini tubularnih epitelnih stanica (64, 67, 76-79).

Akutno stanično odbacivanje po Banff klasifikaciji uključuje: intersticijsku upalu (i), tubulitis (t), intimalni arteritis (v) i glomerulitis (g).

Granične promjene odbacivanja i T stanično posredovano odbacivanje su dvije kategorije definirane u Banff klasifikaciji. Minimalan prag za dijagnozu graničnih promjena akutnog odbacivanja revidiran je na Banff konferenciji 2019.g. i iznosi vrijednost intersticijske upale 1 i vrijednost tubulitisa 1 (i1t1).

T stanično odbacivanje je podijeljeno u T stanično odbacivanje gradus I. (intersticijsko odbacivanje) i T stanično odbacivanje gradus II/III (vaskularno odbacivanje) (12, 67).

Kronično stanično odbacivanje u histopatološkom nalazu najčešće sadržava intersticijsku fibrozu, atrofiju tubula i transplantacijsku glomerulopatiju (77, 80, 81). Stupanj intersticijske upale i fibrozne promjene, značajno su povišene u kasnom, nego u ranom akutnom staničnom odbacivanju. Te promjene su faktor rizika za dugoročno loše preživljenje presatka bubrega (11, 66).

2.7.2 Odbacivanje posredovano protutijelima

Odbacivanje posredovano protutijelima (engl. *Antibody Mediated Rejection, ABMR*), ili humoralno odbacivanje, karakterizira specifično prepoznavanje antigena i uništavanje stanica presatka. To rezultira gubitkom funkcije presatka u prvim tjednima nakon transplantacije, a ne može se razlikovati od staničnog odbacivanja zbog slabog izražaja ili nedostatka specifičnih patohistoloških promjena tkiva.

Humoralno odbacivanje može se razviti i godinama nakon transplantacije, često potaknuto smanjenjem imunosupresije (11, 81).

Odgovorno je za polovicu epizoda akutnih odbacivanja bubrega i za više od polovice slučajeva zatajenja presatka (12).

Akutno humoralno odbacivanje može nastati u bilo koje vrijeme zajedno s akutnim ili kroničnim staničnim odbacivanjem.

Klasifikacija akutnog humoralnog odbacivanja prema Banff kriterijima revidirana je 2017. godine, a uključuje: odlaganje komplementa C4d u peritubularnim kapilarama, cirkulirajuća protutijela specifična za donora i morfološke dokaze za akutno oštećenje tkiva. Treba napomenuti da u 40-50% slučajeva dijagnoza nije pozitivna na bojanje depozita komplementa C4d. Također i detekcija protutijela specifičnih za donora može biti negativna u akutnom humoralnom odbacivanju.

Patohistološke promjene karakteristične za akutno humoralno odbacivanje su fibrinoidna nekroza uz nakupljanje neutrofila u stijenkama arterija i u peritubularnim kapilarama. Česta je i tromboza glomerularnih kapilara, a sigurni znak reakcije odbacivanja posredovanog protutijelima jest nalaz nakupljanja komponente komplementa C4d u stijenkama peritubularnih kapilara (66, 67, 75, 82, 83).

Akutno humoralno i stanično odbacivanje često se istovremeno nađu u histopatološkom nalazu biopsije presatka bubrega, a takav nalaz ukazuje na lošiju prognozu funkcije i preživljenja presatka (80).

Kriteriji za dijagnozu kroničnog aktivnog humoralnog odbacivanja su prisutnost kroničnog oštećenja tkiva sa cirkulirajućim protutijelima specifičnih za donora i odlaganjem komplementa C4d (40, 76).

2.8 Molekula bubrežne ozljede-1

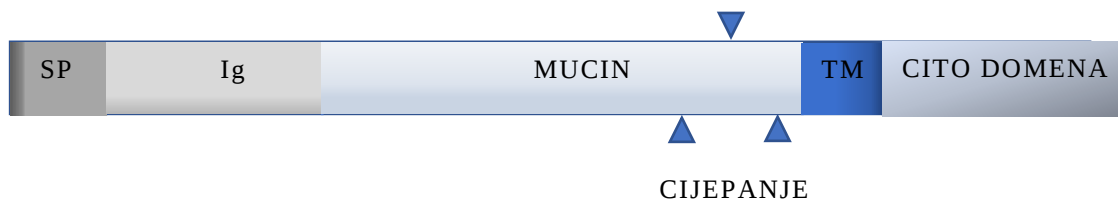
Molekula bubrežne ozljede je transmembranski glikoprotein tip I koji je izražen na mikrovilima četkaste membrane epitelnih stanica proksimalnih tubula bubrega nakon ishemijskog ili toksičnog oštećenja (6-8).

Tijekom prošlih dvadesetak godina objavljeni su radovi u kojima je analizirana ekspresija KIM-1 kao biomarkera akutnog tubularnog oštećenja, čimbenika u regeneraciji epitela tubula bubrega i oporavka bubrežne funkcije.

2.8.1 Struktura i smještaj molekule bubrežne ozljede

Ichimura i sur. su prvi identificirali KIM-1 te mu odredili strukturu i smještaj kao transmembranskom proteinu tip I. Sadrži ekstracelularnu domenu koja je sastavljena od domene slične imunoglobulinu i visoko O-glikozilirane mucinske subdomene, koja nam ukazuje na moguću ulogu u staničnoj adheziji. Unutar stanice se nalazi relativno kratki citoplazmatski rep (6, 7, 84).

KIM-1 poznat je i kao T-limfocitna imunoglobulin mucinska domena-1 (engl. *T-cell immunoglobulin mucin domain-1*, *TIMD-1*), jer ga eksprimira u niskim vrijednostima aktiviranih subpopulacija CD4⁺ T stanica. Nadalje, izražen je i na hepatocitima kao transmembranski protein, stanični receptor-1 virusa hepatitisa A (*HAVCR-1*) (6).



Slika 3. Shematski prikaz molekule bubrežne ozljede-1. Prikazan je segment ektodomene koji je blizu stanične membrane i područje odvajanja molekule. SP, signalni peptid; Ig, imunoglobulin domena; MUCIN, mucinska domena; trokuti predstavljaju mjesta glikolizacije; TM, transmembranska domena; CITO DOMENA, citoplazmatska domena (Preuzeto i prilagođeno prema Zhang i sur. 2007. (87) i Jiayu Song i sur. 2019. (97)).

2.8.2 Funkcija molekule bubrežne ozljede-1

Epitelne stanice proksimalnih tubula bubrega s eksprimiranim receptorom KIM-1 poprimaju fagocitna svojstva te se mogu vezati na specifične epitope koji su izraženi na površini apoptotskih epitelih stanica (6, 84-85).

Studija koju su objavili Yang i suradnici po prvi puta je pokazala da su preživjele epitelne stanice proksimalnih tubula s izraženim receptorom KIM-1 fagocitirale ostatke apoptotskih, nekrotičnih stanica i na taj su način sudjelovale u uklanjanju opstrukcije lumena tubula. Time se smanjuje potreba za profesionalnim fagocitima, makrofagima i dendritičnim stanicama. Ujedno se smanjuje upala i urođeni imuni odgovor u akutnom ishemijskom oštećenju bubrega (86).

U fazi regeneracije, nakon ishemijskog oštećenja, pretpostavlja se da mehanizmi koji odvajaju ektodomenu KIM-1 posreduju u aktiviranju i migraciji preživjelih dediferenciranih stanica na ogoljela mjesta bazalne membrane i obnavljaju kontinuirani epitelni sloj (6, 88, 86, 89).

Nakon ishemijskog oštećenja u tubulima bubrega štakora Ichimura i sur. potvrdili su konfokalnim slikama internalizaciju apoptotskih tjelešaca unutar epitelne stanice koja eksprimira KIM-1. Takvim specifičnim djelovanjem KIM-1 možda doprinosi ne samo u čišćenju ostataka oštećenih i mrtvih stanica, već i u regeneraciji epitela i obnove funkcije tubula (6).

2.8.3 Ekspresija molekule bubrežne ozljede -1

Ekspresija molekule bubrežne ozljede-1, KIM-1, povišena je nakon ishemijske ozljede bubrega i dominantno je lokalizirana na apikalnoj površini preživjelih epitelnih stanica u proksimalnim tubulima. Bazalna strana epitela nije sadržavala molekule KIM-1 čak i kad je uočeno značajno morfološko oštećenje tubula (6-8). Johnson i suradnici su rezultatima analize ekspresije KIM-1 na stanicama proksimalnih tubula u skupinama s akutnim tubularnim oštećenjem i akutnim humoralnim odbacivanjem presatka bubrega dokazali da je akutno oštećenje tubula važna sastavnica akutnog humoralnog odbacivanja (90).

Ekspresija proteina KIM-1 korelira sa stupnjem oštećenja tubula, tubulointersticijskom upalom i fibrozom i jedan je od najboljih pokazatelja funkcije presatka bubrega 6 mjeseci nakon biopsije (8, 90-94).

Humphreys i sur. su u studiji istražili funkcionalne posljedice kronične ekspresije molekule KIM-1 u imortaliziranim epitelnim stanicama tubula bubrega. U modelu u kojem je molekula KIM-1 izražena kronično u odsutnosti bilo kojeg stimulacijskog oštećenja pokazali su da kronična ekspresija molekule KIM-1 dovodi do upale i tubulointersticijske fibroze (88).

Peng i suradnici proučavali su ekspresiju urinarne KIM-1 u zdravoj populaciji te su prema rezultatima donijeli zaključak da razina molekule KIM-1 raste sukladno životnoj dobi (95).

Osim u akutnoj ishemiji, ekspresija KIM-1 značajno je povišena u raznim bubrežnim bolestima kao što su arterijska hipertenzija, glomerulonefritisi, u autosomno dominantnoj policističnoj bubrežnoj bolesti, karcinomu bubrežnih stanica, kroničnoj nefropatiji presatka bubrega te kod akutnog i kroničnog odbacivanja presatka bubrega (6, 83, 96-99).

Prisutnost akutnog tubularnog oštećenja potvrđena je eksprimiranom molekulom KIM-1 . Kada je akutno tubularno oštećenje morfološki umjereno do teško, svi segmenti proksimalnih tubula (S1 do S3) su često zahvaćeni. Blage histopatološke promjene najbolje se potvrđuju prisutnošću molekula KIM-1 u proksimalnim tubulima (91). Molekule KIM-1 se tijekom vremena razmjestе od apikalnog dijela po cijeloj citoplazmi epitelnih stanica S1/S2 segmenta proksimalnih tubula (102). Zhang i suradnici su u studiji pokazali da prisutnost ekspresije molekule KIM-1 senzitivno i specifično identificira oštećenje proksimalnih tubula, a intenzitet ekspresije molekule KIM-1 korelira sa stupnjem oštećenja bubrežne funkcije (8). Nije bilo razlike u morfologiji epitelnih stanica proksimalnih tubula bubrega između onih koje su eksprimirale KIM-1 i onih koje nisu eksprimirale molekule KIM-1. Ovo ukazuje da je ekspresija KIM-1 senzitivnija od histološke analize u detekciji niskog stupnja oštećenja proksimalnog tubula. Kod dokazanog akutnog tubularnog oštećenja ekspresija KIM-1 je detektirana kod svih slučajeva. Ekspresija KIM-1 karakteristično je razmještena uzduž plazmalemalne površine proksimalnog tubularnog epitela i proširena je u lateralne dijelove stanične membrane kada su pokidane čvrste veze.. Zhang i suradnici su primijetili da je i kod upalne infiltracije i tubulitisa ekspresija KIM-1 lokalizirana na apikalnim površinama proksimalnih tubula. Upalne stanice, uključujući limfocite, monocite i plazma stanice, bile su u cijelosti negativne na ekspresiju molekule KIM-1 (8). Metode hibridizacije *in situ* i imunohistokemijske metode otkrile su da je KIM-1 eksprimirana u proliferativnim regenerativnim epitelnim stanicama u proksimalnim tubulima. Podaci o strukturi i ekspresiji ukazuju da je KIM-1 adhezivna molekula epitelnih stanica koja je regulirana u stanicama koje su dediferencirane i prolaze replikaciju (7).

U biopsijama bubrega ljudi, stanice koje eksprimiraju CD24 predstavljaju stanice tubula koje imaju poremećenu morfologiju i ekspresiju markera. Nakon akutnog oštećenja tubula, ove stanice postaju brojnije. Podaci studije Smeetsa ukazuju da stanice koje eksprimiraju CD 24 predstavljaju prolazno dediferencirane stanice tubula koje su uključene u regeneraciju (101).

Epitelne stanice proksimalnih tubula s eksprimiranom KIM-1 mogu regulirati imuni odgovor upalnih stanica sekrecijom kemotaktičnih faktora i ujedno mogu

imati ulogu u patogenezi tubulointersticijske upale tijekom kroničnog bubrežnog oštećenja sekrecijom kemokina/citokina. Izraženost KIM-1 je prisutna u IgA nefropatiji. Intenzivnija ekspresija KIM-1 povezana je s bržom progresijom bolesti (95).

Zhang i suradnici su u studiji analizirali povišene koncentracije odcijepljene ektodomene proteina KIM-1 u uzorcima urina pacijenata s ishemijskim akutnim tubularnim oštećenjem te ju korelirali s uzorcima urina pacijenata s drugim oblicima akutnog ili kroničnog zatajenja. Odcijepljena ektodomena proteina KIM-1 može se detektirati u urinu pacijenata s akutnim tubularnim oštećenjem unutar 12 sati nakon inicijalnog ishemijskog oštećenja i može poslužiti kao koristan biomarker za oštećenje proksimalnih tubula (87).

Skupina autora zaključila je u istraživanjima da je urinarna razina KIM-1 korisna u procjeni težine akutnog oštećenja tubula i ima prognostičku vrijednost koja je slična ili čak bolja nego konvencionalni markeri, volumen urina, razina kreatinina u serumu (SCr) i ureja u krvi (BUN) (83, 92-95).

Van Timmeren i suradnici su pronašli da je visoka urinarna ekskrecija ektodomene KIM-1 prediktor gubitka presatka, bez obzira na dob donora, klirens kreatinina i proteinuriju (94).

2.9 Matriks metaloproteinaze

Brojne studije potvrdile su ulogu matriks metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinase*, *MMP*) u ishemijskom oštećenju bubrega. Nađene su povišene razine MMP-a u renalnim tubulima i u intersticiju. Mali broj radova je objavljen o ekspresiji i djelovanju matriks metaloproteinaze-3 (MMP-3) u transplantiranim bubrezima te je cilj ovog istraživanja bio upoznati ulogu MMP-3 u ishemijsko-reperfuzijskom oštećenju i regeneraciji presatka bubrega.

Lim i suradnici su po prvi puta na primarnim humanim kulturama stanica proksimalnih tubula proučavali staničnu ekspresiju i odvajanja ektodomene KIM-1 uz pomoć matriks metaloproteinaze-3. Zatim su na miševima koji su podvrgnuti ishemiji bubrega analizirali ekspresiju KIM-1 i MMP-3 na stanicama proksimalnih tubula. Pružili su dokaze *in vitro* i *in vivo* da je matriks metaloproteinaza-3 odgovorna za odvajanje ektodomene molekule KIM-1. Dvostrukim imunohistokemijskim bojenjem dokazali su kolokalizaciju proteina MMP-3 i KIM-1. U ljudi nije istražena povezanost ekspresije MMP-3 sa stupnjem akutnog oštećenja i oporavkom bubrega (9).

Punsawad i suradnici su 2017.g. objavili rezultate ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 na tkivima akutno oštećenih bubrega pacijenata preminulih od malarije. Bila je prisutna značajna pozitivna korelacija ekspresije KIM-1 i parametara bubrežne funkcije u akutnom oštećenju bubrega, snažna pozitivna korelacija između ekspresije proteina KIM-1 i tubularne nekroze te ekspresije MMP-3 (102). Rodrigo i suradnici su mjerili koncentraciju MMP-2 i MMP-3 u serumu nakon transplantacije bubrega kod kojih se razvila kronična nefropatija. Rezultati su utvrdili da su povišene koncentracije u serumu proMMP-3 u pozitivnoj korelaciji s vrijednostima kreatinina u serumu i povišene vrijednosti proMMP3 u bubrezima s akutnim odbacivanjem (103).

Ulogu matriks metaloproteinaza u ishemijsko-reperfuzijskom oštećenju podupire nekoliko studija, uključujući nalaz da su MMP-2 i -9 povišene u renalnim tubulima i u intersticiju nakon 1-3 dana od ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja kod štakora. Matriks metaloproteinaza-3 je ekspresirana u ljudskom bubregu u glomerulu i u nekim tubularnim epitelnim stanicama (103, 104).

Ovi podaci podupiru hipotezu da matriks metaloproteinaze sudjeluju u akutnom bubrežnom oštećenju i uključene su u promjene glomerula, povisuju permeabilnost vaskularnog endotela i tubularnih epitelnih stanica (105-110).

2.9.1 Definicija matriks metaloproteinaza

Matriks metaloproteinaze su velika skupina proteolitičkih enzima koji sadrže ion cinka na aktivnom mjestu, remodeliraju komponente ekstracelularnog matriksa i cijepaju brojne proteine na staničnoj površini (104, 107, 111, 112).

Gross i Lapiere su objavili 1962. godine otkriće prvih matriks metaloproteinaza, opisali su aktivnost kolagenaze u metamorfozi punoglavca (113).

Prva ljudska metaloproteinaza izolirana je 1972. godine iz fibroblasta reumatoidne sinovije, a imala je slična svojstva kao i kolagenaza punoglavca koju su u svom radu ranije objavili Gross i Lapiere (111).

2.9.2 Struktura matriks metaloproteinaza

Prototip MMP sastoji se od: prodomene koja je građena od oko 80 aminokiselina, katalitičke domene koja ima oko 170 aminokiselina, te sadrži linker peptid varirajuće dužine koji se naziva i zglobna regija, a sastoji se od hemopeksin domene koja ima oko 200 aminokiselina. Matriks metaloproteinaze se sintetiziraju unutar stanice kao proenzimi sa signalnim peptidom odgovornim za aktivacijom ekstracelularno..

Prodomena se sastoji od cisteinskog ostatka koji sprječava vezanje i odvajanje supstrata dok katalitička domena sadrži vezajuće mjesto sastavljeno od tri histidina koje koordinira s jednim cinkom i odgovorno je za enzimatsku aktivnost proteaze (111, 113).

2.9.3 Podjela matriks metaloproteinaza prema strukturi i djelovanju

MMP kralješnjaka se mogu podijeliti u šest skupina ovisno o strukturi i specifičnosti supstrata na koji djeluju:

1.Kolagenaze

MMP-1, MMP-8, MMP-13 i MMP-18 smještene su u ovu grupu. Glavno svojstvo ovih enzima je sposobnost cijepanja intersticijskih kolagena I, II i III na specifičnom mjestu tri četvrtine od N-terminalnog kraja. Kolagenaze također mogu razgraditi brojne molekule izvanstaničnog matriksa.

2.Gelatinaze

U ovoj grupi su gelatinaza A (MMP-2) i gelatinaza B (MMP-9). One razgrađuju denaturirani kolagen i gelatin.

3.Stromelizin

Stromelizin 1 (MMP-3) i stromelizin 2 (MMP-10) razgrađuju različite komponente ekstracelularnog matriksa i bazalne membrane.

4.Matrilizini

Matrilizin 1 (MMP-7) i matrilizin 2 (MMP-26) su endometaze koje razgrađuju komponente ECM a MMP-7 djeluje i na molekule na staničnoj površini.

5.Membranski tip MMP

Šest je membranskih MMP, četiri su tip I transmembranskih proteina, a dvije MMP su usidreni proteini (MMP-17 i MMP-25).

6.Ostale MMP

Sedam MMP nije klasificirano u prethodne skupine. Metaloelastaze (MMP-12) su većinom izražene u makrofagima i bitne su za migraciju makrofaga (110, 112).

Do sada je identificirano 24 MMP u kralješnjaka, od kojih su 23 pronađene u ljudi. Od trenutno poznatih matriks-metaloproteinaza, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13 i MT-1-MMP su opširno proučavane u bubregu (107).

2.9.4 Funkcija matriks metaloproteinaza

Matriks metaloproteinaze, skupni naziv matriksini, su proteinaze koje sudjeluju u u brojnim biološkim procesima: embriogenezi, remodeliranju ekstracelularnog matriksa, popravku tkiva te u angiogenezi. Gubitak kontrole aktivnosti može rezultirati oboljenjima, kao što su artritis, ateroskleroza, intersticijsku fibroza i invazivno stanično ponašanje (107, 109, 111, 113).

2.9.5 Matriks metaloproteinaza-3

Matriks metaloproteinaza-3 (MMP-3), ili stromelizin-1, razgrađuje različite komponente ekstracelularnog matriksa i bazalne membrane. Uključena je u odvajanje proteinskih ektodomena sa stanične površine i tako može proteolitički aktivirati druge matriks metaloproteinaze (106, 111).

Matriks metaloproteinaza-3 je povišena u lokaliziranoj upali na mjestu vaskularnog pristupa. Endotelne stanice arterija i vena mogu stvarati MMP-3, te su zabilježene povišene razine MMP-3 u vaskularnim poremećajima. Slično je i kod reumatoidnog artritisa gdje povišene razine MMP-3 odražavaju lokalnu sinovijalnu upalu (114).

MMP-3 potiče fibrozu aktiviranjem epitelnih stanica i generiranjem stanica koje su po funkciji slične miofibroblastima (115).



Slika 4. Struktura matriks-metaloproteinaze-3. S, signalni peptid; PRO, prodomena; CAT, katalitička domena; Zn, cink aktivno mjesto; z, zglobna regija; Hpx, hemopeksin (Preuzeto i prilagođeno prema: Visse i sur. 2003. (109)).

2.9.6 Matriks metaloproteinaze u bubregu

Ulogu matriks metaloproteinaza u ishemijsko-reperfuzijskom oštećenju potvrdilo je nekoliko studija, uključujući nalaz da su MMP-2 i -9 povišene u renalnim tubulima i u intersticiju u ishemiji kod štakora te 1-3 dana nakon reperfuzije. Povišena aktivnost MMP-9 povezana je s degradacijom okludina u endotelnim stanicama što povećava vaskularnu permeabilnost.

Ovu hipotezu potvrđuju nalazi da inhibitori MMP umanjuju povišenu mikrovaskularnu permeabilnost nakon IRI (104).

Basile i suradnici su u svojoj studiji također potvrdili imunofluorescentnim bojenjem ekspresiju MMP-2 i 9 u tubulointersticijskom području bubrega štakora koji su podvrgnuti akutnom ishemijskom bubrežnom oštećenju (116).

Brojne studije potvrđuju ulogu matriks metaloproteinaza u akutnom bubrežnom oštećenju tijekom ishemije i reperfuzije, izmjerene su povišene ekspresije navedenih proteina u tubulima i intersticiju. Sudjeluju u promjenama glomerula, povećavaju permeabilnost vaskularnog endotela i tubularnih epitelnih stanica.

Pojačana ekspresija i aktivnost matriks metaloproteinaza identificirana je u brojnim patološkim procesima kao što su glomeruloskleroza, tubulointersticijska fibroza, dijabetička nefropatija, policistična bolest bubrega i karcinom bubrežnih stanica (9, 104-109, 117).

U bubregu je MMP-3 eksprimirana u mezangijalnim stanicama, podocitima glomerula, intersticiju i u epitelnim stanicama proksimalnih tubula.

Lim i suradnici su pružili dokaze in vitro i in vivo da je MMP-3 potaknuta reaktivnim oblicima kisika odgovorna za odvajanje KIM-1 ektodomene u primarnim humanim kulturama epitelnih stanica tubula. Odvajanje ektodomene je precizno regulirani proces koji uključuje kaskade unutarstaničnih signalnih puteva, aktivno se regulira ekspresija i funkcija površinskih molekula i na taj se način modulira široki raspon staničnih i fizioloških procesa (9, 117).

Kunugi i suradnici su identificirali imunohistokemijskom analizom MMP-2 i 9 u peritubularnom intersticiju i kapilarama nakon akutnog oštećenja tubula.

Aktivnosti MMP-2 i 9 značajno su povišene od 2 do 24 sata, s najvećom aktivnosti u 6 sati nakon reperfuzije (118).

Tradicionalno se smatralo da matriks metaloproteinaze imaju antifibrotičku ulogu u razvoju i progresiji kronične bubrežne bolesti. Sada se to promijenilo, s novom paradigmom da MMP imaju ulogu u inicijaciji fibrotičnih poremećaja u bubregu. MMP-3 i MMP-9 potiču epitelno-mezenhimsku tranziciju s posljedičnom konverzijom epitela u fibroblastični ili miofibroblastični fenotip stanice (113).

Sanders i suradnici su u biopsijama bubrega zabilježili povišenu ekspresiju matriks metaloproteinaze-2,-3,-9 u glomerulima i tubulointersticiju kod aktivnog nekrotizirajućeg glomerulonefritisa (119).

Matriks metaloproteinaze su važne u sustavu regulacije homeostaze ekstracelularnog matriksa.

U kroničnoj nefropatiji bubrežnog presatka koja je karakterizirana prekomjernim nakupljanjem ekstracelularnog matriksa uočena je redukcija aktivnosti tj smanjenje izraženosti MMP-1,2,3 i 9 te povećanje regulacije tkivnih inhibitora MMP-2 i 3 (10, 120).

Rodrigo i suradnici su analizirali povišene koncentracije proMMP-2 i proMMP-3 u serumu pacijenata s kroničnom transplantacijskom nefropatijom, uspoređujući ih s koncentracijama kod presađaka sa stabilnom funkcijom, epizodom akutnog odbacivanja te kod zdravih donora. Histološko obilježje kroničnog bubrežnog odbacivanja je progresivna fibroza u kojoj važnu ulogu ima preobražaj ekstracelularnog matriksa. Povišene razine ovih metaloproteinaza odražavaju promjene glomerularnog i intersticijskog ekstracelularnog matriksa u kroničnoj transplantacijskoj nefropatiji i time ukazuju na ulogu u patogenezi ovog stanja (103).

Podaci studije Preston i suradnika ukazuju da su prisutne povišene razine MMP-2 i MMP-3 u serumu dijaliziranih pacijenata. Budući da dijaliza može biti povezana s lokalnom i sistemskom upalom, povišene razine MMP-3 u hemodijaliznoj grupi mogu poslužiti kao marker za kroničnu, lokalnu upalu (114).

2.9.7 Regulacija matriks metaloproteinaza

Inaktivni oblici matriks metaloproteinaza smješteni su u epitelnim stanicama proksimalnih i distalnih tubula i sabirnih kanalića. Glomerularna ekspresija matriks metaloproteinaza također se javlja intracelularno u epitelnim i mezangijalnim stanicama (10).

U normalnim, fiziološkim uvjetima, aktivnost MMP je regulirana na razini transkripcije te izvanstanične aktivacije prekursora pro-MMP proteinazama (109, 112, 121).

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Uzorci biopsija

Istraživanje je bilo retrospektivno, anonimizirano i provedeno u dvije zdravstvene ustanove, u Kliničkoj bolnici Dubrava i Kliničkoj bolnici Merkur. Analizirani su uzorci biopsija presađak bubrega uklopljenih u parafinske blokove iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu.

Podaci o funkciji presatka bubrega, prikupljeni su iz baze podataka Transplantacijskog centra za solidne organe Kliničke bolnice Merkur.

Istraživanje se provodilo uz odobrenje Etičkog povjerenstva KB Merkur i KB Dubrava uz poštivanje etičkih načela i bioetičkih principa koji su u skladu s Deklaracijom iz Helsinkija i Deklaracijom iz Istanbula.

S obzirom da je istraživanje retrospektivno, nije traženo potpisivanje posebnog informiranog pristanka. Svi bolesnici potpisali su informirani pristanak u trenutku stavljanja na listu čekanja za transplantaciju bubrega, u kojem pristaju na korištenje podataka prikupljenih prilikom standardnih medicinskih postupaka u svrhu istraživanja i analize.

U istraživanju se nisu koristili podaci koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost bolesnika. Prikupljeni podaci bili su dostupni voditelju istraživanja. Svaki bolesnik dobio je jedinstven broj, a pravi identitet radi zaštite podataka bio je poznat samo istraživačima.

Kao kriterij za adekvatnost uzorka korištena je Banff klasifikacija patohistoloških promjena u presatku bubrega (minimalno 10 glomerula po uzorku) tj. korišteni su oni uzorci kojima je mogao biti određen Banff skor akutnog tubularnog oštećenja. Bioptati presatka bubrega bili su podijeljeni po skupinama prema vremenu uzorkovanja u odnosu na dan transplantacije: nulta biopsija, protokolarne biopsije nakon 6 mjeseci i nakon 12 mjeseci od transplantacije presađak bubrega te kod odgođene funkcije presađak indikacijske biopsije uzorkovane od 7 do 14 dana nakon transplantacije.

Biopsija bubrega se izvodila pod kontrolom ultrazvuka pomoću biopsijskog uređaja, koaksijalnom iglom od 16-Gaugea, ili 18-Gaugea tj promjera, 1,65 i 1,27 mm (123).

3.2 Priprema uzoraka

Uzorci su pripremljeni i obojeni prema standardnim metodama pripreme histološkog preparata za dijagnostiku svjetlosnim mikroskopom.

Za svjetlosnu mikroskopsku analizu uzorci biopsija su fiksirani u 4%-tnom puferiranom formalinu, dehidrirani u alkoholu, izbistre se u ksilolu te su uklopljeni u parafin. Uklopljeni u parafin, uzorci su pomoću mikrotoma uzdužno narezani na debljinu od 4 mikrometra. Nakon toga su obojeni metodom hemalaun-eozinom, zatim specijalnim-histokemijskim bojenjem metodom PAS (engl. Periodic acid-Schiff) te metodom bojenja po Masson-trikrom (122, 123).

Metoda PAS je specijalno histokemijsko bojenje koja se temelji na reakciji oksidacije u prisutnosti perjodne kiseline i Schiffovog reagensa. Molekule s glikolnim grupama pod utjecajem perjodne kiseline stvaraju aldehide na koje djeluje Schiffov reagens te budu obojani ljubičasto. Metodom PAS analiziraju se nesupstituirani polisaharidi, neutralni mukopolisaharidi, mukoproteini i glikoproteini, glikolipidi i fosfolipidi (122, 123).

Proces PAS metode: deparafinacija u supstitutu ksilen; rehidracija u 100%-tnom alkoholu, 95%-tnom alkoholu, destiliranoj vodi; tretman 0.8% otopinom Perjodne kiseline; ispiranje tekućom vodom te destiliranom vodom; tretman Schiff reagensom i sulfitnom otopinom; ispiranje tekućom vodovodnom vodom; bojenje Hematoksilinom; ispiranje tekućom vodovodnom vodom; dehidracija u 70%-tnom, 95%-tnom i 100%-tnom alkoholu; bistrenje supstitutom ksilena (122, 123).

Metodom Masson Trichrome_je specijalno histokemijsko bojenje mišićnih i kolagenskih vlakana u tkivima pri čemu se boja Aniline Blue veže za kolagen dajući mu karakteristično plavo obojenje. Koristi se za vizualizaciju povećanog nakupljanja kolagena koje se veže uz zamjenu funkcionalnog tkiva s ožiljkastim tkivom, ali i za razlikovanje glatkih mišićnih vlakana i kolagena.

Proces Masson Trichrome metode: deparafinacija u supstitutu ksilena; rehidracija u 100%-tnom, 95%-tnom alkoholu i destiliranoj vodi; tretiranje Bouinovu otopinom; ispiranje tekućom vodovodnom vodom i destiliranom vodom; bojenje Hematoksilinom, Weigert A i Feri reagensom, Weigert B; ispiranje tekućom vodovodnom vodom; bojenje Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin reagensom; ispiranje destiliranom vodom; tretman PTA-PMA reagensom bez ispiranja; bojenje Aniline Blue reagensom ; ispiranje destiliranom vodom; tretman 1%-tnom otopinom octene kiseline; dehidracija 95%-tnim, 100%-tnim alkoholom; bistrenje supstitutom ksilena (122-124).

3.2.1 Imunohistokemijsko bojenje

Proces deparafiniranja i demaskiranja antigena provodi se kuhanjem u puferu „3 u 1“ pH 9.0. (Antigen Retrieval Solution high pH, DM 828, Agilent Technologies, Dako, USA) u uređaju PT Link koristeći otopine *Dako Wash Buffer* x (Code S3006) i otopinu za demaskiranje proteina (Target Retrieval Solution, High pH (Link) (K800421-2; Agilent Dako Technologies, USA) ili Target Retrieval Solution, Low pH (Link) (K800521-2; Agilent Dako Technologies, USA)) na +80 C/20 min prema uputama proizvođača.

Pri imunohistokemijskoj analizi korištena su protutijela TIM-1 (Abcam, UK, Anti-TIM 1, ab78494, zečje poliklonalno, razrjeđenje 1:100) i MMP-3 (Abcam, UK, Anti-MMP3, ab52915, zečje monoklonalno, razrjeđenje 1:100), koristeći set za vizualizaciju izražaja navedenih proteina LSAB HRP (Link System-HRP (DAB+)) protokolom, dvostupanjskom imunohistokemijskom tehnikom bojenja. Protokol se temelji na HRP-obilježenom polimeru koji je konjugiran sa sekundarnim antitijelima. Označeni polimer ne sadrži avidin ili biotin. Posljedično, nespecifično bojenje koje nastaje zbog endogene aktivnosti avidin-biotina u jetri, bubrezima, limfoidnom tkivu i kriostatskim presjecima je eliminirano ili značajno smanjeno. Aktivnost nespecifične endogene peroksidaze blokira se inkubacijom uzorka s dvostrukim endogenim enzimskim blokom. Uzorak se zatim inkubira s odgovarajuće mišjim ili zečjim primarnim antitijelom, nakon čega slijedi inkubacija s obilježenim polimerom koristeći preporučenu inkubaciju prema uputama proizvođača. Bojenje se dovršava inkubacijom s 3,3'-

diaminobenzidinskim (DAB+) supstratnim kromogenom, što rezultira smeđim obojenjem antigena. Hematoksilin se koristio kao kontrastno bojenje, plavo bojenje jezgara čime se stvara optimalna vizualna razlika između smeđe kromogene boje DAB i plave boje hematoksilina. To olakšava poboljšanu vizualizaciju tkiva na preparatima, procjenu morfologije tkiva i identifikaciju obojenih struktura i stanica (124).

Ekspresija proteina KIM-1 u stanicama primarno je membranska i citoplazmatska, dok je protein MMP-3 primarno eksprimiran u citoplazmi i izvanstaničnom matriksu. Učinjena je analiza intenziteta ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 na serijskim rezovima biopsije bubrega.

3.3 Analiza preparata

Rutinsku patohistološku analizu uzoraka biopsija presađaka bubrega izvršio je patolog D.G.LJ. u Kliničkom zavodu za patologiju Kliničke bolnice Dubrava u svrhu potvrde/isključivanja akutnog oštećenja tubula, odgođene funkcije presatka i akutnog staničnog odbacivanja. Histološke preparate obrađene imunohistokemijskim bojenjem u Klinici za patologiju u Kliničkoj bolnici Merkur analizirao je patolog A.Š. metodom slijepog pokusa.

Pri analizi preparata korišteni su mikroskopi Olympus BX 51 (Olympus Europa SE & Co. KG).

Promatrane su patohistološke promjene u akutnom tubularnom oštećenju (ATO), koje su kvantificirane postotkom tubula koji pokazuju stanično oštećenje, gubitak mikrovila, stvaranje odljevnikih cilindara i dilataciju tubula i to prema: 0, nijedan; 1, 1%-25%; 2, 26%-45%; 3, 46%-75%; 4, >76%. Po svakom preparatu analizirano je najmanje 10 vidnih polja (povećanja x200).

Numerički sustav ocjenjivanja promjena za svaki histološki dio bubrežnog parenhima kao: 0, nema patoloških promjena; 1, blage promjene; 2, umjerene promjene; 3, umjereno teške promjene i 4, teške promjene bubrežnog parenhima.

Analizirano je akutno stanično odbacivanje presatka bubrega i kronične promjene prema kriterijima Banff klasifikacije.

Banff klasifikacija je prva standardizirana međunarodna klasifikacija patohistološke analize biopsija bubrežnih presađaka objavljena 1993.godine. Skupina patologa, nefrologa i transplantacijskih kirurga sastala se 1991. godine u Banffu u Kanadi i formulirali su nomenklaturu i klasifikaciju patologije bubrežnog presađka (41).

Klasifikacija promjena bioptata je uključivala analizu intersticija, tubula, krvnih žila i glomerula. Patohistološki nalaz biopsije bubrežnog presađka može biti: normalan nalaz, hiperakutno odbacivanje, granične promjene, akutno odbacivanje, kronična nefropatija presađka te promjene koje nisu posljedice odbacivanja.

U patohistološkoj analizi biopsije tkiva presađka bubrega određena su obilježja akutnog oštećenja presađka s ukupnim skorom: intersticijska upala (oznaka "i"), tubulitis (oznaka "t"); glomerulitis (oznaka "g") i intimalni arteritis (oznaka "v"); zatim kronični skorovi intersticijska fibroza (oznaka "ci"); tubularna atrofija (oznaka "ct") i peritubularni kapilaritis (oznaka "ptc").

Prema Banff klasifikaciji iz 2019. godine (41) kriteriji za akutne histopatološke promjene intersticija i tubula bubrega, donja granica za suspektno, granično, stanično odbacivanje je definirana: intersticijska upala (oznaka "i") ≥ 1 i tubulitis (oznaka "t") ≥ 1 . Nadalje, akutno stanično odbacivanje tip I je $\geq i2 \geq t2$, te kriterij za akutno stanično odbacivanje tip II je intimalni arteritis (oznaka "v") po skorovima v1, v2 i v3.

Analizirali smo ekspresiju proteina KIM-1 i MMP-3 prilikom epizode akutnog odbacivanja, tj analizirali smo sve uzorke s granicom $\geq i1 \geq t1$.

Prema Banff klasifikaciji iz 2019. godine (41) kriteriji za kronične histopatološke promjene intersticija i tubula bubrega su: intersticijska fibroza (oznaka "ci"); atrofija tubula (oznaka "ct"); novonastala fibroza intime arterija uz suženje lumena (oznaka "cv"), s ukupnim skorom kroničnog aktivnog odbacivanja $\geq i2 \geq t2$ i komponentom intersticijska fibroza i tubularna atrofija (IF/TA).

U Banff klasifikaciji iz 2001.g. istaknuta je povezanost nakupljanja komponente komplementa C4d s kraćim preživljenjem presađka. Imunoekspresija komplementa C4d na peritubularnim kapilarama (ptc) prihvaćena je kao marker za odbacivanje posredovano protutijelima sa skorovima od 1 do 3.

Patohistološki, akutno stanično odbacivanje definirano je kao: intersticijska upala (oznaka “i”); tubulitis (oznaka “t”); intimalni arteritis (oznaka “v”) i glomerulitis (oznaka “g”).

Za dijagnozu akutnog odbacivanja uz intersticijsku upalu (oznaka “i”), potreban je i nalaz tubulitisa (oznaka “t”) ili arteritisa (oznaka “v”).

Patohistološki se kronično stanično odbacivanje definira kao: intersticijska fibroza (oznaka “ci”); atrofija tubula (oznaka “ct”); novonastala fibroza intime arterija uz suženje lumena (oznaka “cv”) (41).

Analizirali smo progresiju kroničnih histoloških promjena u disfunkciji presatka: intersticijsku fibrozu (oznaka “ci”) i tubularnu atrofiju (oznaka “ct”).

Stupnjevanje stadija IF/TA (39, 40):

Stadij 1 IF/TA karakterizira blaga fibroza intersticija (od 6 do 25% kortikalnog područja) i blaga atrofija tubula (do 25%). U stadiju 2 IF/TA prisutna je umjerena fibroza intersticija (od 26 do 50%) i umjerena atrofija tubula (od 26 do 50%), dok je u stadiju 3 IF/TA prisutna jaka intersticijska fibroza (više od 50% kortikalnog područja) i tubularna atrofija (više od 50% kortikalnih tubula).

Kvantifikacija kriterija za mononuklearnu staničnu intersticijsku upalu “i”:

i0, nema mononuklearnog staničnog infiltrata intersticija; i1, od 10 do 25 % mononuklearni stanični upalni infiltrat parenhima; i2, od 26 do 50 % mononuklearni stanični upalni infiltrat parenhima; i3, više od 50% mononuklearni stanični upalni infiltrat parenhima (12).

Kvantifikacija kriterija za tubulitis “t”: t0, nema mononuklearnog staničnog infiltrata u tubulima; t1, nakupine s 1 do 4 mononuklearnog staničnog infiltrata po tubulu; t2, nakupine s 5 do 10 mononuklearnog staničnog infiltrata po presjeku tubula; t3, nakupine s više od 10 stanica mononuklearnog staničnog infiltrata po presjeku tubula.

Većina studija koristila je pojedinačne histološke promjene za procjenu kroničnih promjena i preživljenje presatka, a neke su koristile složene kronične skorove koji su se sastojali od zbroja pojedinačnih Banff vrijednosti (12, 61). Imunohistokemijski pozitivno bojenje na KIM-1 i MMP-3 definirano je kao crveno-smeđe granulirano obojenje u neutrofičnim proksimalnim tubulima (102).

Ekspresija proteina KIM-1 i MMP-3 u analiziranim uzorcima tkiva bubrega određivana je semikvantitativno, određeno vrijednostima od 0 do 4+ na pozitivnom obojenju u citoplazmi, ili na staničnoj membrani epitelnih stanica tubula:

0, nema bojenja;

1+, slabo granulirani pozitivitet fokalno prisutan na luminalnoj površini neatrofičnih proksimalnih tubula;

2+, slabo granulirani pozitivitet okružuje cijelu cirkumferenciju luminalne površine neatrofičnih proksimalnih tubula;

3+, umjereno granulirani pozitivitet okružuje cijelu cirkumferenciju luminalne površine neatrofičnih proksimalnih tubula i širi se u međustanične prostore i lateralno;

4+, jako granulirani pozitivitet okružuje cijelu cirkumferenciju luminalne površine neatrofičnih proksimalnih tubula i lateralno (8, 94, 97).

3.4 Gradacija vrijednosti kreatinina i glomerularne filtracije

Pri određivanju vrijednosti serumskog kreatinina korištene su standardne laboratorijske metode laboratorija u KB Merkur. Vrijednosti kreatinina u serumu izražene su u $\mu\text{mol/l}$ u definiranim periodima nakon transplantacije: nulta biopsija, 7-10 dana od transplantacije, 6 mjeseci i 12 mjeseci od transplantacije.

Bubrežna funkcija procijenjena je vrijednostima serumskog kreatinina te izračunom procjene glomerulske filtracije (engl. *Estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR*) MDRD formulom (engl. *Modification of Diet in Renal Disease*).

Procjena glomerulske filtracije GF

$$\text{eGFR (ml/min/1,73 m}^2\text{)} = 175 \times [\text{kreatinin u serumu (mg/dL)}]^{-1,154} \times [\text{dob}]^{-0,203} \times (1,212 \text{ afroamerikanci}) \times (0,742 \text{ ženski spol}) \quad (16)$$

Vrijednosti kreatinina u serumu ($\mu\text{mol/L}$) podijelili smo po gradusima: u gradusu I. vrijednosti kreatinina su manje ili jednake $100 \mu\text{mol/L}$; u gradusu II, vrijednosti kreatinina su od 101 do $200 \mu\text{mol/L}$; u gradusu III, vrijednosti kreatinina su od 201 do $400 \mu\text{mol/L}$; u gradusu IV vrijednosti se kreću od 401 do $600 \mu\text{mol/L}$ te u gradusu V vrijednosti kreatinina su veće od $600 \mu\text{mol/L}$.

Vrijednosti procijenjene glomerulske filtracije (ml/min) podijelili smo po gradusima: u gradusu I vrijednosti glomerulske filtracije su veće ili jednake 90 ml/min; u gradusu II vrijednosti su od 60 do 89 ml/min; vrijednosti glomerulske filtracije u gradusu III su od 30 do 59 ml/min; u gradusu IV vrijednosti su od 15 do 29 ml/min te u gradusu V vrijednosti glomerulske filtracije su manje ili jednake 15 ml/min.

3.5 Statističke metode

Podaci su prikazani tablično i grafički. Numeričke varijable testirane su na normalnost raspodjele Shapiro-Wilksovim testom. Numeričke vrijednosti prikazane su kao srednja vrijednost, medijan i standardna devijacija. Kolmogorov-Smirnovljevim testom potvrđena je raspodjela kvantitativnih podataka koja značajno odstupa od normalne raspodjele te su se u daljnjoj statističkoj analizi koristili odgovarajući neparametrijski testovi: Mann-Whitney U test ponavljajuća mjerenja ANOVA, usporedbe parova Durbin-Conover). Za usporedbu grupa prema nominalnim kategorijskim varijablama korišten je χ^2 test. Korelacije između dvije kontinuirane varijable analizirane su Pearsonovom korelacijom.

Razlike u kvantitativnim vrijednostima između ispitivanih skupina u pojedinim vremenima mjerenja analizirane su Kruskal-Wallisovim testom, dok su razlike u kategorijskim vrijednostima analizirane Fisher-Freeman-Haltonovim testom. Razlike u zavisnim mjerenjima (dinamika promjene mjerenih vrijednosti unutar pojedinih skupina) analizirane su Friedmanovim testom s tim da u ovu analizu nije uzeta vrijednost 7 dana nakon transplantacije budući da su te vrijednosti bile dostupne samo za skupine s odgođenom funkcijom presatka (OFP). Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnima.

U analizi se koristila programska podrška: The jamovi project (2022.), Jamovi (Version 2.3), R Core Team (2021.) R: A Language and environment for statistical computing (Version 4.1) Pohlert T. (2018.), PMCMR: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums. R package, IBM SPSS Statistics za Windows, verzija 29.0.1.

4 REZULTATI

4.1 Uzorci tkiva

U istraživanje je uključen 31 presađak bubrega koji su transplantirani pacijentima s kroničnim terminalnim zatajenjem funkcije bubrega, alociranim unutar zaklade međunarodne organizacije Eurotransplant. Temelji se na četiri opća načela: očekivani rezultat nakon presađivanja, razina hitnosti koju su ustanovili stručnjaci, vrijeme čekanja i nacionalno uravnotežena raspodjela organa kojima se nastoji optimalno iskoristiti raspoložive organe donora (125).

Prva skupina uzoraka biopsija bile su 31 nulta biopsija koje su činile dvije podskupine. U prvoj podskupini bilo je 12 nultih biopsija transplantiranih bubrega s akutnim oštećenjem tubula s očuvanom primarnom funkcijom presatka. U drugoj podskupini bilo je 19 nultih biopsija transplantiranih bubrega s akutnim oštećenjem tubula kod kojih se razvila odgođena funkcija presatka te su uzorkovane indikacijske biopsije 7 dana nakon transplantacije.

U trećoj skupini bile su 31 biopsija bubrega s graničnim i akutnim staničnim odbacivanjem.

Učinjena je analiza intenziteta ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem u uzorcima biopsija presađaka bubrega. Izmjerene su vrijednosti kreatinina u serumu i vrijednosti procijenjene glomerulske filtracije. Analizirana je korelacija intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 s rezultatima gore navedene semikvantitativne patohistološke analize akutnog oštećenja tkiva bubrega kao i korelacija s vrijednostima kreatinina u serumu i procijenjene glomerulske filtracije. Vrijednosti kreatinina u serumu ($\mu\text{mol/L}$) uzorkovane su prilikom postupka transplantacije, zatim u slučaju OFP uzorkovan je 7 dana nakon transplantacije, 6 mjeseci i 12 mjeseci nakon transplantacije.

Kontrolna skupina su 10 uzoraka zdravog tkiva bubrega u pacijenata kojima je kirurški odstranjen bubreg zbog tumora. Uzorci kontrolne skupine bili su označeni oznakom "K1, K2..." od strane istraživača.

Protokolarne biopsije presađaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega. Uzorkovane su nulte biopsije, biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije i 12 mjeseci nakon transplantacije. Provedena je analiza intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem (Tablica 4.).

Tablica 4. Uzorci protokolarnih biopsija presadaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega. Analiza intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 (KIM-1) i matriks metaloproteinaze-3 (MMP-3) imunohistokemijskim bojenjem.

KIM-1	Gradus	Nulta biopsija n=21	6 mjeseci n=20	12 mjeseci n=21
	0	0	4	3
	1	7	7	7
	2	9	4	6
	3	4	2	3
	4	1	3	2
MMP-3	Gradus	Nulta biopsija n=21	6 mjeseci n=20	12 mjeseci n=21
	0	0	1	0
	1	6	11	10
	2	7	7	7
	3	8	1	4
	4	0	0	0

* KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks metaloproteinaze-3. Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presadaka bubrega.

U skupini protokolarnih biopsija presadaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega provedena je patohistološka analiza akutnog tubularnog oštećenja (ATO) Uzorkovane su nulte biopsije, biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije i 12 mjeseci nakon transplantacije. (Tablica 5).

Tablica 5. Uzorci protokolarnih biopsija presadaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega. Patohistološka analiza težine akutnog tubularnog oštećenja (ATO).

ATO	Gradus	Nulta biopsija n=19	6 mjeseci n=21	12 mjeseci n=21
	0	0	7	5
	1	11	12	9
	2	6	1	3
	3	1	1	4
	4	1	0	0

*ATO gradus, težina akutnog tubularnog oštećenja; Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presadaka bubrega.

Provedena je analiza kreatinina u serumu prilikom postupka transplantacije tj. nulte biopsije, na dan biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije i na dan biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije (Tablica 6.).

Tablica 6. Uzorci vrijednosti gradusa koncentracije kreatinina u serumu u vrijeme uzimanja protokolarnih biopsija presadaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega.

SCr gradus	Gradus	Nulta biopsija n=20	6 mjeseci n=21	12 mjeseci n=21
	0	0	3	10
	1	3	17	7
	2	1	1	4
	3	6	0	0
	4	10	0	0

*SCr gradus, gradacija vrijednosti koncentracije kreatinina u serumu; Podjela vrijednosti koncentracije kreatinina u serumu ($\mu\text{mol/L}$) po gradusima: Gradus I $\leq 100 \mu\text{mol/L}$, Gradus II $101-200 \mu\text{mol/L}$, Gradus III $201-400 \mu\text{mol/L}$, Gradus IV $401-600 \mu\text{mol/L}$, Gradus V $> 600 \mu\text{mol/L}$. Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presadaka bubrega.

Provedena je patohistološka analiza akutnih promjena u uzorcima protokolarnih biopsija presadaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega: uzorkovane su nulte biopsije, biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije i 12 mjeseci nakon transplantacije. Provedena je patohistološka analiza akutnih promjena presatka bubrega: intersticijski upalni infiltrat (i), tubulitis (t), glomerulitis (g) i intimalni arteritis (v) skorirani iprema Banff klasifikaciji (Tablica 7.).

Tablica 7. Banff skor akutnih promjena u uzorcima protokolarnih biopsija presađaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega.

Banff skor patohistoloških promjena akutnog staničnog odbacivanja	Nulta biopsija n=19	6 mjeseci n=21	12 mjeseci n=21
Intersticijski upalni infiltrat (i)			
0	19	17	14
1	0	4	6
2	0	0	0
3	0	0	1
Tubulitis (t)			
0	19	17	12
1	0	3	5
2	0	1	3
3	0	0	1
Glomerulitis (g)			
0	19	21	18
1	0	0	2
2	0	0	0
3	0	0	1
Intimalni arteritis (v)			
0	19	21	21
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0

* i skor, gradus težine intersticijskog upalnog infiltrata; t skor, težina promjena tubulitisa; g skor, težina promjena glomerulitisa; v skor, težina promjena intimalnog arteritisa. Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Provedena je patohistološka analiza kroničnih promjena uzoraka protokolarnih biopsija presađaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega: intersticijska fibroza (ci) i tubularna atrofija (ct) skorirani prema Banff klasifikaciji. Uzorkovane su nulte biopsije, biopsije 6 mjeseci i 12 mjeseci nakon transplantacije (Tablica 8).

Tablica 8. Banff skor kroničnih promjena intersticijske fibroze i tubularne atrofije u uzorcima protokolarnih biopsija presađaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega.

Banff skor patohistoloških kroničnih upalnih promjena	Nulta biopsija n=19	6 mjeseci n=21	12 mjeseci n=21
Intersticijska fibroza (ci)			
0	15	13	5
1	4	8	9
2	0	0	7
3	0	0	0
Tubularna atrofija (ct)			
0	14	8	2
1	5	13	12
2	0	0	7
3	0	0	0

* ci skor, težina kronične promjene intersticijske fibroze; ct skor, težina kronične promjene tubularne atrofije. Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Analiza protokolarnih biopsija presađaka bubrega s primarnom funkcijom bubrega. Uzorkovane su nulte biopsije, biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije i 12 mjeseci nakon transplantacije. Provedena je analiza intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem (Tablica 9.).

Tablica 9. Uzorci biopsija presađaka bubrega s odgođenom funkcijom bubrega. Provedena je analiza intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 (KIM-1) i matriks metaloproteinaze-3 (MMP-3) imunohistokemijskim bojenjem.

KIM-1	Gradus intenziteta imunohistokemijskog bojenja	Nulta biopsija n=16	7 dana n=16	6 mjeseci n=16	12 mjeseci n=16
	0	0	0	1	0
	1	8	6	5	3
	2	6	6	5	3

	3	2	3	3	6
	4	0	1	2	4
MMP-3	Gradus intenziteta imunohistokemijskog bojenja	Nulta biopsija n=16	7 dana n=16	6 mjeseci n=16	12 mjeseci n=16
	0	0	0	0	0
	1	1	2	6	4
	2	10	13	8	7
	3	5	1	2	5
	4	0	0	0	0

* KIM-1 gradus, gradus ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus ekspresije matriks metaloproteinaze-3. Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 7 dana, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Provedena je patohistološka analiza protokolarnih biopsija presađaka bubrega s odgođenom funkcijom bubrega. Uzorkovane su nulte biopsije, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije, biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije i 12 mjeseci nakon transplantacije. Provedena je patohistološka analiza akutnog tubularnog oštećenja (ATO) (Tablica 10.).

Tablica 10. Patohistološka analiza akutnog tubularnog oštećenja (ATO) u uzorcima biopsija presađaka bubrega s odgođenom funkcijom bubrega.

ATO	Gradus	Nulta biopsija n=16	7 dana n=16	6 mjeseci n=16	12 mjeseci n=16
	0	0	0	9	14
	1	5	3	6	1
	2	9	8	1	1
	3	2	4	0	0
	4	0	1	0	0

* ATO gradus, težina akutnog tubularnog oštećenja; Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 7 dana, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Provedena je analiza kreatinina u serumu prilikom postupka transplantacije tj. nulte biopsije, 7 dana nakon transplantacije, na dan biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije i na dan biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije (Tablica 11.).

Tablica 11. Provedena je analiza koncentracije kreatinina u serumu po gradusima u vrijeme uzimanja biopsija presađaka bubrega s odgođenom funkcijom bubrega.

SCr	Gradus	Nulta biopsija n=13	7 dana n=13	6 mjeseci n=15	12 mjeseci n=15
	1	0	0	0	0
	2	0	0	1	2
	3	2	2	12	11
	4	3	4	2	2
	5	8	5	0	0

* SCr gradus, gradacija koncentracije kreatinina u serumu; Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 7 dana, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Provedena je patohistološka analiza akutnih promjena u uzorcima protokolarnih biopsija presađaka bubrega s odgođenom funkcijom bubrega: uzorkovane su nulte biopsije, indikacijske biopsije zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije, biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije i 12 mjeseci nakon transplantacije. Provedena je patohistološka analiza akutnih promjena presatka bubrega: intersticijski upalni infiltrat (i), tubulitis (t), glomerulitis (g) i intimalni arteritis (v) skorirani prema Banff klasifikaciji (Tablica 12.).

Tablica 12. Uzorci biopsija presađaka bubrega s odgođenom funkcijom bubrega. Patohistološka analiza akutnih promjena: intersticijski upalni infiltrat (i), tubulitis (t), glomerulitis (g) i intimalni arteritis (v) skorirani prema Banff klasifikaciji.

Banff skor patohistoloških promjena akutnog staničnog odbacivanja	Nulta biopsija n=16	7 dana n=16	6 mjeseci n=16	12 mjeseci n=16
Intersticijski upalni infiltrat(i)				
0	16	7	11	11
1	0	6	3	3
2	0	2	2	1
3	0	1	0	1
Tubulitis (t)				
0	16	8	11	11
1	0	5	3	1
2	0	1	1	2
3	0	2	1	2
Glomerulitis (g)				
0	16	16	16	15
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	1
Intimalni arteritis (v)				
0	16	12	16	15
1	0	4	0	0
2	0	0	0	1
3	0	0	0	0

* i gradus, gradus težine intersticijskog upalnog infiltrata; t gradus, težina promjena tubulitisa; g gradus, težina promjena glomerulitisa; v gradus, težina promjena intimalnog arteritisa. Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 7 dana, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Provedena je patohistološka analiza kroničnih promjena uzoraka protokolarnih biopsija presađaka bubrega s odgođenom funkcijom bubrega: intersticijska fibroza (ci) i tubularna atrofija (ct) skorirani prema Banff klasifikaciji. Uzorkovane su

nulte biopsije, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije, biopsije 6 mjeseci i 12 mjeseci nakon transplantacije (Tablica 13).

Tablica 13. Uzorci biopsija presađaka bubrega s odgođenom funkcijom bubrega. Patohistološka analiza kroničnih promjena: intersticijska fibroza (ci) i tubularna atrofija (ct) skorirani prema Banff klasifikaciji.

Banff skor patohistoloških kroničnih upalnih promjena	Nulta biopsija n=16	7 dana n=16	6 mjeseci n=16	12 mjeseci n=16
Intersticijska fibroza (ci)				
0	14	13	6	4
1	2	3	8	9
2	0	0	2	1
3	0	0	0	2
Tubularna atrofija (ct)				
0	11	10	4	4
1	5	6	10	9
2	0	0	2	1
3	0	0	0	2

* ci skor, težina kronične promjene intersticijske fibroze; ct skor, težina kronične promjene tubularne atrofije. Nulta biopsija, uzorak nulte biopsije; 7 dana, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Provedena je analiza nultih biopsija presađaka bubrega kod kojih se nakon transplantacije javila epizoda graničnog akutnog i akutnog staničnog odbacivanja prema Banff kriterijima patohistološke analize. Provedena je patohistološka analiza i gradacija akutnog tubularnog oštećenja (ATO) te analiza intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem. Dva uzorka nultih biopsija su uklonjena iz analize zbog neadekvatne kvalitete materijala prema kriterijima Banff klasifikacije. (Tablica 14.).

Tablica 14. Uzorci 29 multih biopsija transplantiranih bubrega kod kojih se tijekom 12 mjeseci javila epizoda graničnog akutnog i akutnog staničnog odbacivanja prema Banff kriterijima patohistološke analize. Provedena je patohistološka analiza i gradacija akutnog tubularnog oštećenja (ATO) te imunohistokemijska analiza intenziteta obojenja na molekulu bubrežne ozljede-1 (KIM-1) i matriks metaloproteinazu-3 (MMP-3) i gradacija.

Gradus	ATO broj uzoraka	KIM-1 broj uzoraka	MMP-3 broj uzoraka
0	0	0	0
1	12	14	7
2	13	12	10
3	3	2	12
4	1	1	0

*Gradus, prema patohistološkoj analizi težina akutnog tubularnog oštećenja (ATO) te gradacija intenziteta imunohistokemijskog obojenja stanica proksimalnih tubula transplantiranih bubrega na molekulu bubrežne ozljede-1 (KIM-1) i matriks metaloproteinazu-3 (MMP-3).

Provedena je analiza intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem u indikacijskim biopsijama presadaka bubrega 7 dana nakon transplantacije, 9 protokolarnih biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije i 12 protokolarnih biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije u kojima je patohistološkom analizom potvrđena epizoda graničnog akutnog ili akutnog staničnog odbacivanja prema Banff kriterijima (Tablica 15).

Tablica 15. Uzorci biopsija presadaka bubrega u kojima je patohistološkom analizom potvrđena epizoda graničnog akutnog ili akutnog staničnog odbacivanja prema Banff kriterijima. Provedena je analiza intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 (KIM-1) i matriks metaloproteinaze-3 (MMP-3) imunohistokemijskim bojenjem.

KIM-1	Gradus	7 dana	6 mjeseci	12 mjeseci
	0	0	1	0
	1	6	4	1
	2	3	4	5

	3	1	0	3
	4	0	0	3
MMP-3	Gradus	7 dana	6 mjeseci	12 mjeseci
	0	0	0	0
	1	6	7	2
	2	2	2	6
	3	2	0	4
	4	0	0	0

* KIM-1 gradus (+), gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus (+), gradus intenziteta ekspresije matriks metaloproteinaze-3; 7 dana, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Provedena je patohistološka analiza akutnih promjena: intersticijski upalni infiltrat (i), tubulitis (t), skorirani prema Banff klasifikaciji u indikacijskim biopsijama presađaka bubrega 7 dana nakon transplantacije, 9 protokolarnih biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije i 12 protokolarnih biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije u kojima je patohistološkom analizom potvrđena epizoda graničnog akutnog ili akutnog staničnog odbacivanja prema Banff kriterijima (Tablica 16).

Tablica 16. Patohistološka analiza uzoraka biopsije prema Banff klasifikaciji na skorove intersticijske upale (i) i tubulitis (t) za određivanje graničnog odbacivanja i akutnog staničnog odbacivanja, kriterij odabira je $i \geq 1$ i $t \geq 1$.

Skor i	7 dana	6 mjeseci	12 mjeseci
1	5	4	9
2	4	4	1
3	1	1	2
Skor t			
1	6	4	5
2	1	2	4
3	3	3	3

* skor “i”, skor težine intersticijskog upalnog infiltrata; skor “t”, težina promjena tubulitisa; g gradus, težina promjena glomerulitisa; v gradus, težina promjena intimalnog arteritisa; 7 dana, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Provedena je analiza procijenjene glomerulske filtracije. Vrijeme uzorkovanja 7 dana, 6 mjeseci i 12 mjeseci nakon transplantacije bubrega (Tablica 17)

Tablica 17. Procijenjena glomerulska filtracija (eGFR) u skupini uzoraka biopsija transplantiranih bubrega s epizodom graničnog i akutnog staničnog odbacivanja.

eGFR	7 dana	6 mjeseci	12 mjeseci
1	0	0	1
2	0	3	3
3	1	4	8
4	4	2	0
5	5	0	0

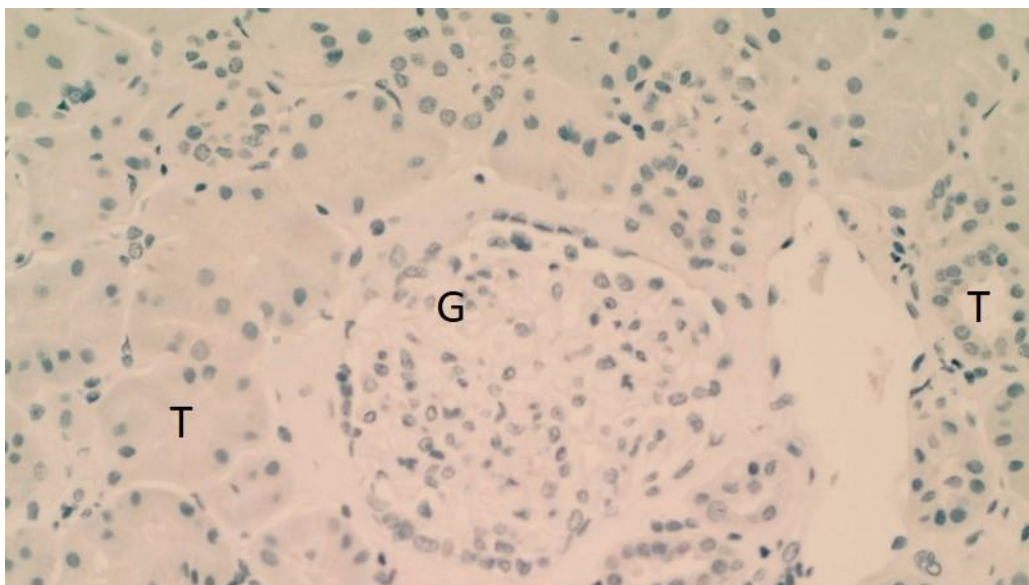
*eGFR, gradus procijenjene glomerulske filtracije; 7 dana, indikacijska biopsija zbog odgođene funkcije bubrega 7 dana nakon transplantacije; 6 mjeseci, uzorak biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mjeseci, uzorak biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije; n, broj uzoraka biopsija presađaka bubrega.

Provedena je analiza intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem u Kontrolnoj skupini 10 nefrektomiranih bubrega zbog maligne tvorbe, angiomiolipoma te policistične bolesti bubrega. Uzorci zdravog tkiva imunohistokemijski su obrađeni za ekspresiju molekule KIM-1 i MMP-3 (Tablica 18)

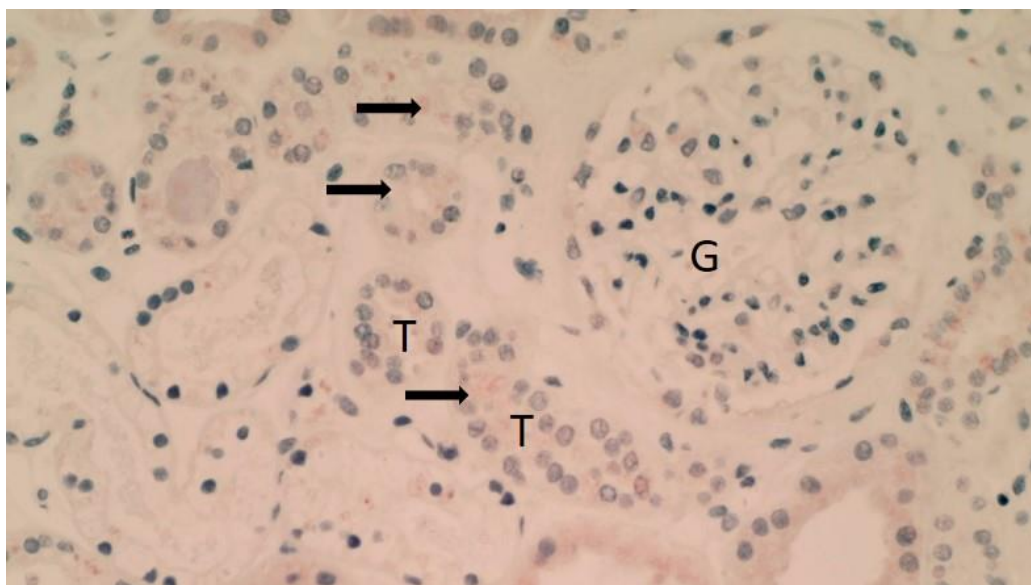
Tablica 18. Kontrolna skupina 10 nefrektomiranih bubrega.

Uzorak	SCr gradus	KIM-1 gradus (+)	MMP-3 gradus (+)	Osnovna bolest
K1	1	0	1	RCC
K2	1	0	2	RCC
K3	1	1	1	RCC
K4	N/A	0	1	RCC
K5	1	0	2	Angiomiolipom
K6	1	0	1	ADPKD
K7	1	0	2	RCC
K8	1	0	2	RCC
K9	1	0	1	RCC
K10	2	0	1	RCC

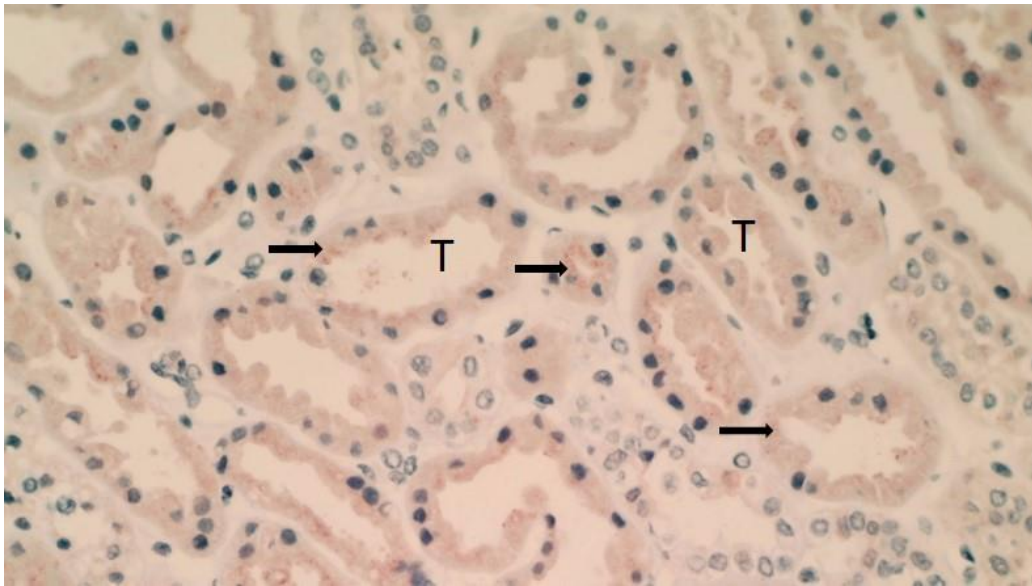
* Uzorci su uzeti iz zdravog tkiva nefrektomiranih bubrega zbog karcinoma bubrežnih stanica (engl. *Renal Cell Carcinoma*, *RCC*), angiomiolipoma i autosomno dominantne policistične bolesti bubrega (engl. *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*, *ADPKD*). SCr, kreatinin u serumu; KIM-1, molekula bubrežne ozljede-1, MMP-3, matriks metaloproteinaza-3; N/A-nije analizirano



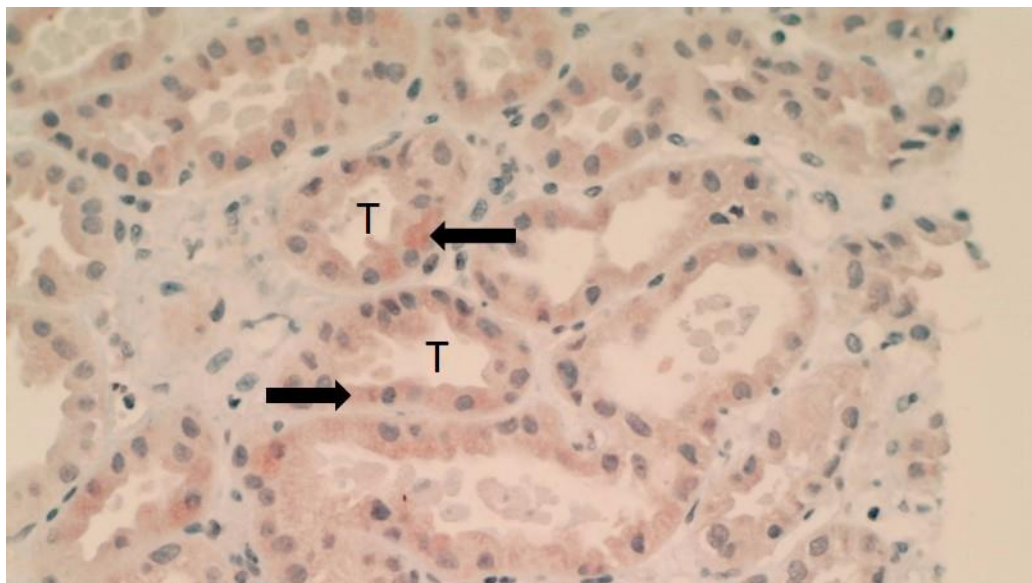
Slika 5. Uzorak biopsije presatka bubrega. Analiza intenziteta ekspresije KIM-1 imunohistokemijskim bojenjem. Ne nalazi se ekspresije KIM-1. T-tubul bubrega, G-glomerul. Povećanje 200x. Broj biopsije 366/13.



Slika 6. Uzorak biopsije presatka bubrega. Analiza intenziteta ekspresije KIM-1 imunohistokemijskim bojenjem. Imunohistokemijsko smeđe obojenje, gradus 1+, slabo granulirani pozitivitet fokalno prisutan na luminalnoj površini neatrofičnih proksimalnih tubula. T- tubul, G-glomerul. Crna strelica: slabo granulirano obojenje stanica tubula. Povećanje 200x. Broj biopsije 127/14.

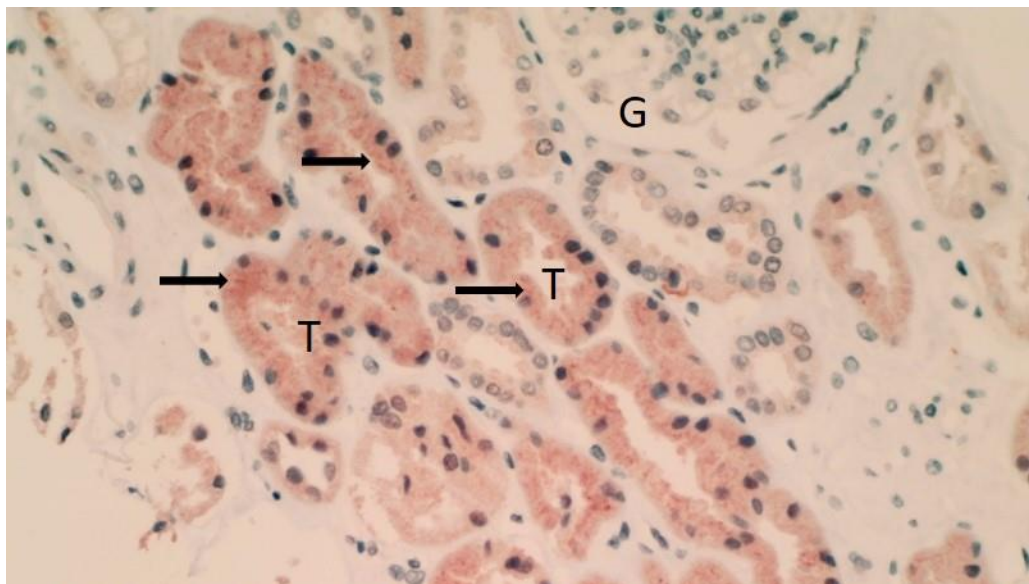


Slika 7. Uzorak biopsije presatka bubrega. Analiza intenziteta ekspresije KIM-1 imunohistokemijskim bojenjem. Imunohistokemijsko smeđe obojenje, ekspresije KIM-1 gradus 2+. Slabo granulirani pozitivitet okružuje cijelu cirkumferenciju luminalne površine neatrofičnih proksimalnih tubula. T-tubul. Crna strelica: slabo granulirano obojenje stanica tubula. Povećanje 200x. Broj biopsije 133/14.

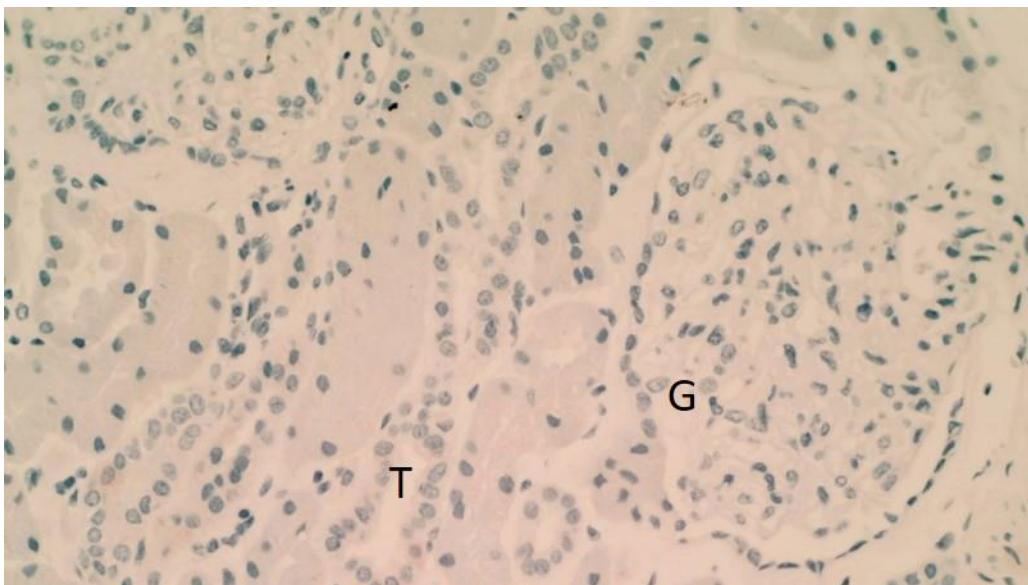


Slika 8. Uzorak biopsije presatka bubrega. Analiza intenziteta ekspresije KIM-1 imunohistokemijskim bojenjem. Imunohistokemijsko smeđe obojenje, ekspresija KIM-1 gradus 3+. Umjereno granulirani pozitivitet okružuje cijelu cirkumferenciju luminalne površine neatrofičnih proksimalnih tubula i širi se u međustanične

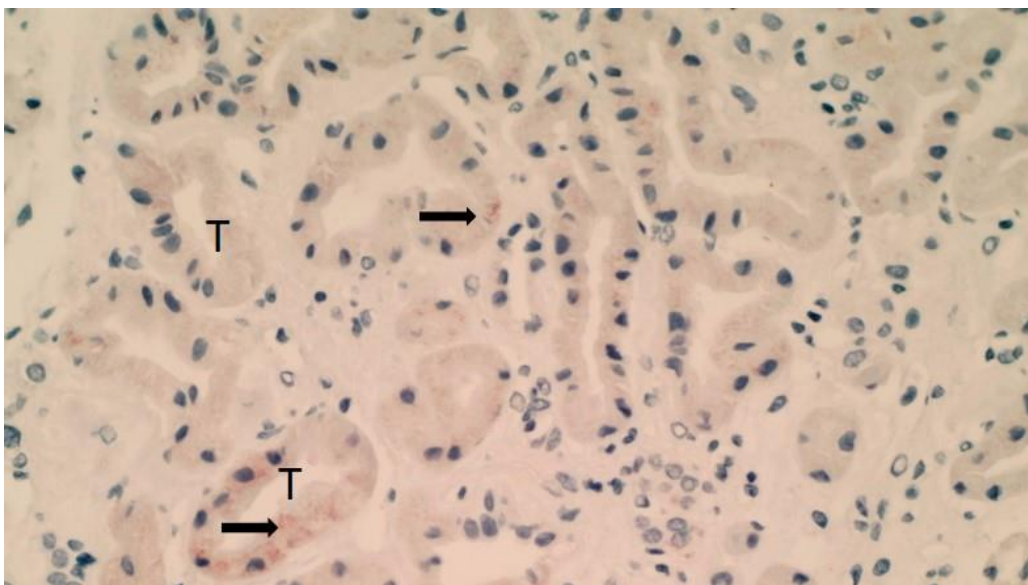
prostore i lateralno. T-tubul. Crna strelica: umjereno granulirano obojenje stanica tubula. Povećanje 200x. Broj biopsije 142/14.



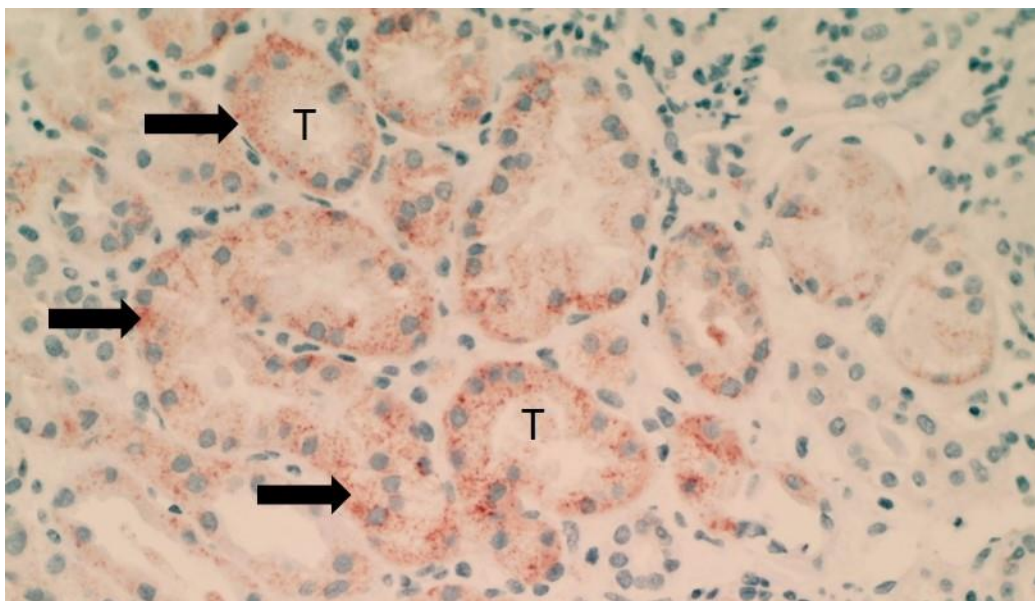
Slika 9. Uzorak biopsije presatka bubrega. Analiza intenziteta ekspresije KIM-1 imunohistokemijskim bojenjem. Imunohistokemijsko smeđe obojenje, ekspresija KIM-1 gradus 4+. Jako granulirani pozitivitet okružuje cijelu cirkumferenciju luminalne površine neutrofičnih proksimalnih tubula i lateralno. T-tubul, G-glomerul. Crna strelica: jako granularno obojenje stanica tubula. Povećanje 200x. Broj biopsije 180/15.



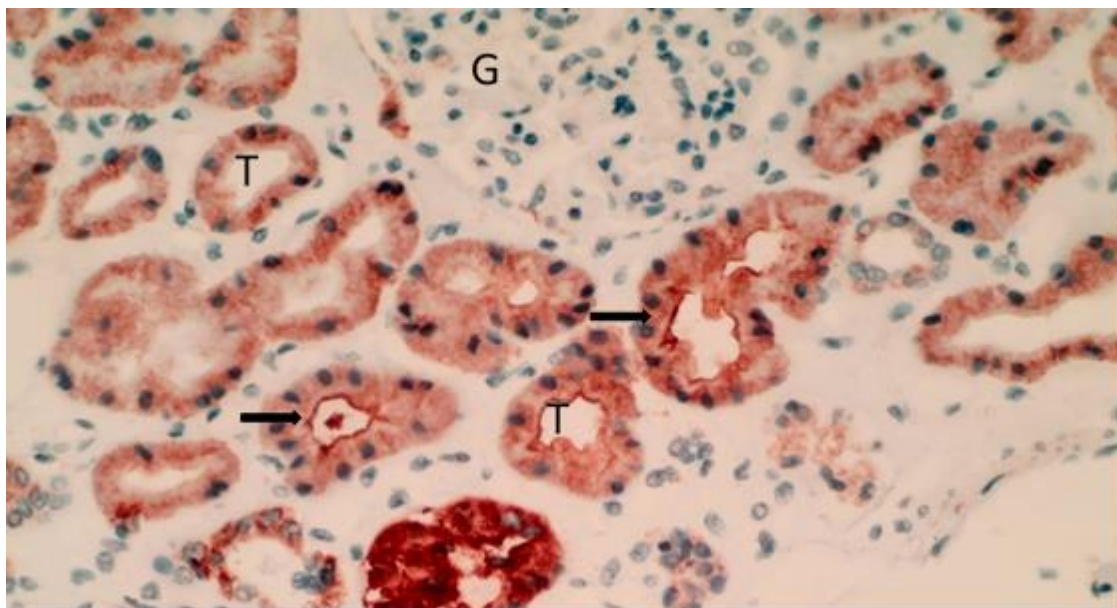
Slika 10. Uzorak biopsije presatka bubrega. Analiza intenziteta ekspresije MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem. Ne nalazi se ekspresije MMP-3.. G-glomerul, T-tubul., nema obojenja MMP-3, gradus 0. Povećanje 200x. Broj biopsije 366/13.



Slika 11. Uzorak biopsije presatka bubrega. Analiza intenziteta ekspresije MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem. Imunohistokemijsko crveno-smeđe obojenje slabo granulirano obojenje, ekspresija MMP-3, gradus 1+. T-tubul. Crna strelica: obojenje stanica tubula. Povećanje 200x. Broj biopsije 444/11.



Slika 12. Uzorak biopsije presatka bubrega. Analiza intenziteta ekspresije MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem. Imunohistokemijsko crveno-smeđe obojenje, slabo granulirano pozitivno obojenje cijele cirkumferencije, ekspresija MMP-3, gradus 2+. T-tubul. Crna strelica: obojenje stanica tubula. Povećanje 200x. Broj biopsije 142/14.



Slika 13. Uzorak biopsije presatka bubrega. Analiza intenziteta ekspresije MMP-3 imunohistokemijskim bojenjem. Imunohistokemijsko crveno-smeđe obojenje. Umjereno granulirano obojenje cijele cirkumferencije, ekspresija MMP-3 gradus 3+. T-tubul, G-glomerul. Crna strelica: obojenje stanica tubula. Povećanje 200x. Broj biopsije 180/15.

Analiziran je 31 presađak transplantiranih bubrega pri čemu je utvrđeno da su svi promatrani parametri (ATO, KIM-1 i MMP-3 gradus) bili nepravilno distribuirani (Shapiro-Wilk test). Isto je primijećeno i u analizi bioptata nakon šest i 12 mjeseci pri čemu je izostavljeno iz analize 9 uzoraka 6 mjeseci nakon transplantacije i izostavljeno je iz analize 10 uzoraka 12 mjeseci nakon transplantacije zbog suboptimalne kvalitete za analizu prema Banff klasifikaciji (Tablica 19).

Tablica 19. Karakteristike uzoraka biopsija transplantiranih bubrega.

	ATO gradus nulta bx	KIM- 1 gradus nulta bx	MMP- 3 gradus nulta bx	ATO gradus 6 mj bx	KIM- 1 gradus 6 mj bx	MMP- 3 gradus 6 mj bx	ATO gradus 12 mj bx	KIM- 1 gradus 12 mj bx	MMP- 3 gradus 12 mj bx
N	31	31	31	22	22	22	21	21	21
N/A	0	0	0	9	9	9	10	10	10
Srednja vrijednost	1,45	1,77	2,19	1,18	1,82	1,86	1,28	1,71	1,71
Medijan	1,00	2,00	2,00	1,00	1,50	2,00	1,00	2,00	2,00
Standardna devijacija	0,506	0,884	0,749	0,395	1,33	0,899	1,030	1,161	0,765
Minimum	1	0	1	1	0	0	0	0	1
Maksimum	2	4	3	2	4	3	3	4	3
Shapiro- Wilk W	0,635	0,878	0,798	0,474	0,877	0,866	0,395	0,831	0,815
Shapiro- Wilk p	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,011	0,007	<0,001	0,012	0,015

*N, broj uzoraka biopsija transplantiranih bubrega; nulta bx, uzorci nultih biopsija; 6 mj bx, biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mj bx, biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije; ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnogoštećenja; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks-metaloproteinaze-3, N/A, nije analizirano.

Navedene su srednje vrijednosti i medijani promatranih parametara u uzorcima nultih biopsija presađaka bubrega po skupinama s primarnom funkcijom i s odgođenom funkcijom. Analizirani su gradusi intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1, matriks metaloproteinaze-3, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja, vrijednosti i gradusi vrijednosti koncentracije kreatinina u serumu te gradus procijenjene glomerularne filtracije. Podjednake su srednje vrijednosti gradusa ekspresije KIM-1 i MMP-3 u obje skupine nultih biopsija uz podjednake srednje vrijednosti gradusa akutnog oštećenja tubula. (Tablica 20).

Tablica 20. Karakteristike uzoraka nultih biopsija transplantiranih bubrega s primarnom funkcijom presatka i nultih biopsija s odgođenom funkcijom presatka (OFP).

	OFP NE = 0 DA = 1	KIM-1 gradus	MMP-3 gradus	ATO gradus	SCr	SCr gradus	eGFR gradus
Srednja vrijednost	0 1	2,00 1,58	2,05 2,32	1,55 1,71	558 711	4,15 2,86	4,65 3,29
Medijan	0 1	2,00 1	2,00 2	1,00 2	600 705	4,50 2,50	5,00 3,50
Stand. dev.	0 1	0,858 0,692	0,826 0,582	0,826 0,686	233 209	1,09 1,75	0,875 1,77
Min.	0 1	1 1	1 1	1 1	113 342	2 1	2 1
Maks.	0 1	4 3	3 3	4 3	915 1048	5 5	5 5

* OFP, odgođena funkcija presatka, NE = 0-nije prisutna OFP; DA = 1-prisutna je OFP; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks-metaloproteinaze-3; ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja; SCr, serumski kreatinin, SCr gradus, gradus vrijednosti serumskog kreatinina; eGFR, procijenjena glomerulska filtracija; Stand. dev, standradna devijacija; Min, minimalna vrijednost; Maks, maksimalna vrijednost.

Uzorci presađaka transplantiranih bubrega višeg patohistološkog gradusa ATO imali su značajno veće vrijednosti SCr-a i niže vrijednosti eGFR-a u odnosu na uzorke presađaka s nižim patohistološkim gradusom ATO, dok kod ostalih promatranih parametara nisu primijećene razlike. Analiza po Mann-Whitney U testu (Tablica 21).

Tablica 21. Povezanost vrijednosti gradusa akutnog tubularnog oštećenja s gradusima ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 i matriks metaloproteinaze-3 te vrijednostima kreatinina u nultim biopsijama.

	p vrijednost
KIM-1 bx0 gradus	0,115
MMP-3 bx0 gradus	0,322
ATO bx0 gradus	0,335
SCr bx0	0,083
SCr bx0 gradus	0,031
eGFR bx0 gradus	0,008

$H_a \mu_0 \neq \mu_1$

* KIM-1 bx0 gradus, gradus ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 u nultoj biopsiji; MMP-3 bx0 gradus, gradus ekspresije matriks-metaloproteinaze-3 u nultoj biopsiji; ATO bx0 gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja u nultoj biopsiji; SCr bx0, koncentracija serumskog kreatinina u vrijeme transplantacije; SCr bx0 gradus, gradus vrijednosti koncentracije serumskog kreatinina u vrijeme transplantacije; eGFR bx0 gradus, gradus procijenjene glomerulska filtracija u vrijeme transplantacije. P vrijednost <0,05, statistički značajna.

Prema našim rezultatima analizom snage korelacije prema Pearson r pokazatelju u nultim biopsijama nije bilo statistički značajnih korelacija između analiziranih varijabli: patohistološkog gradusa ATO, gradusa intenziteta ekspresije KIM-1 i gradusa intenziteta ekspresije MMP-3 (Tablica 22).

Tablica 22. Povezanost između gradusa akutnog tubularnog oštećenja (ATO), gradusa ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 i gradusa ekspresije matriks-metaloproteinaze-3 u nultim biopsijama.

Nulta biopsija		ATO gradus	KIM-1 gradus	MMP-3 gradus
ATO gradus	Pearson's r df p-vrijednost	- - -		
KIM-1 gradus	Pearson's r df p-vrijednost	-0,212 29 0,253	- - -	
MMP-3 gradus	Pearson's r df p-vrijednost	0,201 29 0,277	-0,284 29 0,121	- - -

* ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja;; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks-metaloproteinaze-3. P vrijednost <0,05, statistički značajna.

Gradus ATO 6 mjeseci nakon transplantacije bio je značajno niži, a 12 mjeseci nakon transplantacije nije pronađena statistički značajno niža vrijednost. Analizirana je dinamika promjene akutnog tubularnog oštećenja po usporedbi u parovima (Durbin-Conover) tako da je statistički značajna promjena između patohistološkog gradusa ATO nultih biopsija i patohistološkog gradusa ATO u biopsijama 6 mjeseci nakon transplantacije bila $P = 0,003$.

Statistički nema značajne promjene između patohistološkog gradusa ATO u uzorcima biopsije 6 mjeseci nakon transplantacije i uzorcima biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije (Tablica 23).

Tablica 23. Promjene gradusa akutnog tubularnog oštećenja (ATO) tijekom 12 mjeseci.

ATO gradus	p vrijednost
nulta bx- 6 mj bx	0,003
nulta bx- 12 mj bx	0,075
6 mj bx- 12 mj bx	0,176

* ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenj; nulta bx, nulta biopsija; 6 mj bx, biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije bubrega; 12 mj bx, biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije bubrega. P vrijednost <0,05, statistički značajna.

Analiza nultih biopsija kod kojih se razvila OFP. U analizi je nedostajalo 5 uzoraka koncentracije kreatinina u serumu na dan transplantacije. Također su nedostajal 2 patohistološka nalaza nultih biopsija. Utvrđeno je da su gradus koncentracije kreatinina u serumu, gradus vrijednosti procijenjene glomerulske filtracije, Banff skor intersticijskog upalnog infiltrata, Banff skor tubulitisa, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 i gradus intenziteta ekspresije matriks-metaloproteinaze-3 bili nepravilno distribuirani prema Shapiro-Wilk testu (Tablica 24).

Tablica 24. Karakteristike nultih biopsija kod kojih se razvila odgođena funkcija presatka.

	SCr gradus	eGFR gradus	i	t	ATO gradus	KIM-1 gradus	MMP-3 gradus
N	14	14	19	19	17	19	19
N/A	5	5	0	0	2	0	0
Srednja vrijednost	2,86	3,28	0	0	1,71	1,58	2,31
Medijan	2,50	3,50	0	0	2,00	1,00	2,00
Standardna devijacija	1,75	1,77	0	0	0,69	0,69	0,58
Minimum	1	1	0	0	1	1	1
Maksimum	5	5	0	0	3	3	3
Shapiro- Wilk W	0,816	0,788	/	/	0,789	0,751	0,744
Shapiro- Wilk p	0,007	0,003	/	/	<0,001	<0,001	<0,001

* N, broj uzoraka; SCr gradus, gradus koncentracije kreatinina u serumu; eGFR gradus, gradus vrijednosti procijenjene glomerulske filtracije; i, Banff skor intersticijskog upalnog infiltrata; t, Banff skor tubulitisa; ATO gradus,

patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks-metaloproteinaze-3, P vrijednost <0,05, statistički značajna; N/A, nije analizirano.

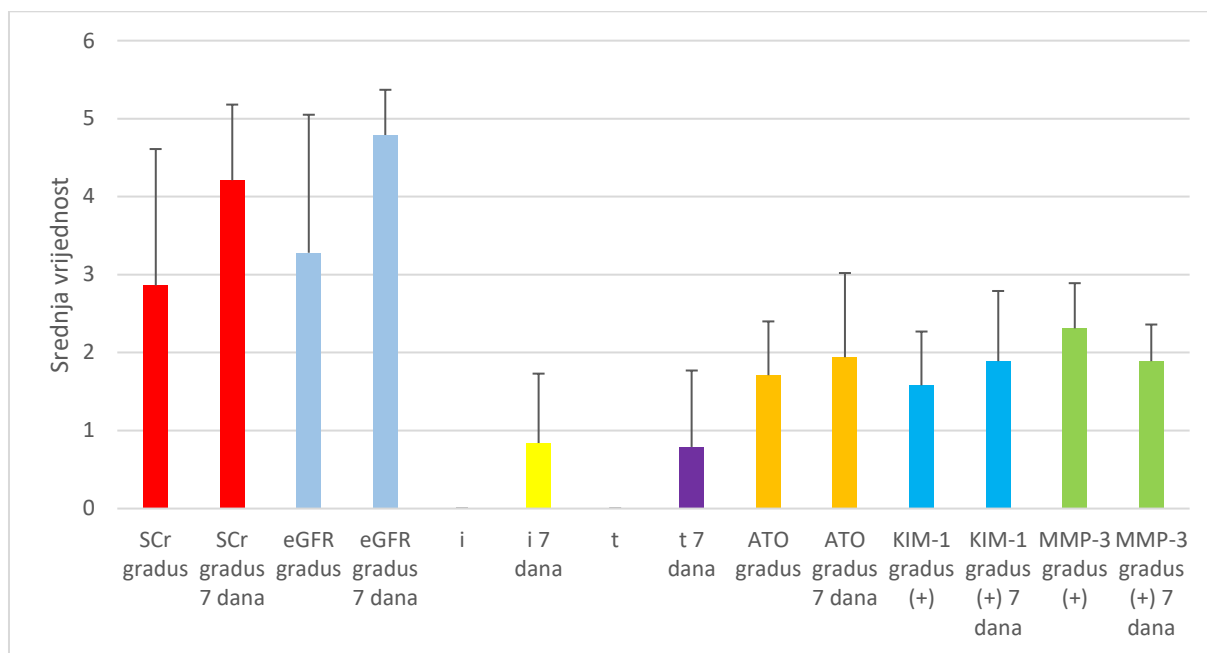
U indikacijskim biopsijama 7 dana nakon transplantacije, bubrezi s OFP imali su značajno veće graduse eGFR-a (5.0 vs. 3.5), i (1 vs. 0), t (1 vs. 0) te niže graduse intenziteta ekspresije MMP-3 (medijan je isti = 2, no prosjeci su 1.89 vs. 2.39). U ostalim promatranim parametrima nisu pronađene razlike između nultih biopsija i biopsija 7 dana nakon transplantacije. U analizi je nedostajalo 5 uzoraka koncentracije kreatinina u serumu na dan transplantacije. Tijekom imunohistokemijske obrade 1 uzorak obrađen na KIM-1 i 1 uzorak obrađen na MMP-3 je bio neadekvatne kvalitete te je izostavljen iz analize. (Tablica 25) (Slika 14).

Tablica 25. Karakteristike uzoraka biopsija s odgođenom funkcijom presatka 7 dana nakon transplantacije.

	SCr gradus	eGFR gradus	i	t	ATO gradus	KIM-1 gradus (+)	MMP-3 gradus (+)
N	14	14	19	19	19	18	18
N/A	5	5	0	0	0	1	1
Srednja vrijednost	4,21	4,79	0,84	0,79	1,94	1,89	1,89
Medijan	4,50	5,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00
Standardna devijacija	0,97	0,58	0,89	0,98	1,08	0,90	0,47
Minimum	2	3	0	0	0	1	1
Maksimum	5	5	3	3	4	4	3
Shapiro- Wilk W	0,794	0,438	0,823	0,758	0,924	0,836	0,642
Shapiro- Wilk p	0,004	<0,001	0,002	<0,001	0,134	0,005	<0,001

* N, broj uzoraka; SCr gradus, gradus koncentracije kreatinina u serumu; eGFR gradus, gradus vrijednosti procijenjene glomerulske filtracije; “i”, Banff skor

intersticijskog upalnog infiltrata; “t”, Banff skor tubulitisa; ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks metaloproteinaze-3; P vrijednost <0,05, statistički značajna; N/A, nije analizirano.



Slika 14. Parametri funkcije transplantiranih bubrega kod kojih se razvila odgođena funkcija presatka. Srednje vrijednosti analiziranih parametara sa standardnim devijacijama u nultim biopsijama presadaka i 7 dana nakon transplantacije.* SCr, serumski kreatinin; eGFR, procijenjena glomerulska filtracija; i, intersticijska upala; t, tubulitis; ATO, akutno tubularno oštećenje; KIM-1, molekula bubrežne ozljede-1; MMP-3, matriks metaloproteinaza-3.

Analiza promjene parametara u skupini s odgođenom funkcijom presatka prema Wilcoxon testu. Prema našim rezultatima između nultih biopsija presadaka i biopsija 7 dana nakon transplantacije postojala je značajna promjena vrijednosti:

gradusa eGFR ($P=0,01$), Banff skora intersticijskog upalnog infiltrata ($P=0,003$), Banff skora tubulitisa ($P=0,005$) i gradusa intenziteta ekspresije MMP-3 ($P=0,03$) između nultih biopsija presađaka i biopsija 7 dana nakon transplantacije (Tablica 26).

Tablica 26. Promjene parametara između nultih biopsija presađaka i biopsija 7 dana nakon transplantacije u skupini s odgođenom funkcijom presatka.

	N	T	Z	P
SCr gradus	11	11,00000	1,956039	0,050461
eGFR gradus	9	1,50000	2,487865	0,012852
i	11	0,00000	2,934058	0,003346
t	10	0,00000	2,803060	0,005062
ATO gradus	14	37,00000	0,973035	0,330536
KIM-1 gradus	11	20,00000	1,155841	0,247747
MMP-3 gradus	9	4,50000	2,132456	0,032970

* SCr gradus, gradus koncentracije kreatinina u serumu; eGFR gradus, gradus vrijednosti procijenjene glomerulske filtracije; “i”, Banff skor intersticijskog upalnog infiltrata; “t”, Banff skor tubulitisa; ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks metaloproteinaze-3; P vrijednost $<0,05$, statistički značajna.

Prema rezultatima prikazanima u Tablici 27 nije bilo statistički značajne povezanosti između patohistološkog gradusa ATO, gradusa intenziteta ekspresije KIM-1 i gradusa intenziteta ekspresije MMP-3 u nultim biopsijama ispitanika s OFP.

Tablica 27. Povezanost između gradusa akutnog tubularnog oštećenja (ATO), gradusa ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 (KIM-1) i gradusa ekspresije matriks-metaloproteinaze-3 (MMP-3) u nultim biopsijama presađaka s odgođenom funkcijom.

Nulta biopsija		ATO gradus	KIM-1 gradus	MMP-3 gradus
----------------	--	------------	--------------	--------------

ATO gradus	Spearman R t (N-2) P			
KIM-1 gradus	Spearman R t (N-2) P	-0,091 -0,355 0,727		
MMP-3 gradus	Spearman R t (N-2) P	0,267 1,07 0,299	-0,165 -0,690 0,499	

* ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks-metaloproteinaze-3. P vrijednost <0,05, statistički značajna.

Prema našim rezultatima postojala je značajna razlika u gradusu ekspresije MMP-3 koji je bio značajno viši s povećanjem patohistološkog gradusa ATO u biopsijama 7 dana nakon transplantacije (Tablica 28).

Tablica 28. Povezanost između gradusa akutnog tubularnog oštećenja (ATO), gradusa ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 (KIM-1) i gradusa ekspresije matriks-metaloproteinaze-3 (MMP-3) u biopsijama 7 dana nakon transplantacije.

Bx 7 dana		ATO gradus	KIM-1 gradus	MMP-3 gradus
ATO gradus	Spearman R t (N-2) P			
KIM-1 gradus	Spearman R t (N-2) P	0,393 1,711 0,106		
MMP-3 gradus	Spearman R t (N-2) P	0,663 3,539 0,003	0,119 0,482 0,636	

* ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks-metaloproteinaze-3. P vrijednost <0,05, statistički značajna.

Analizom snage korelacije prema Pearsonu, gradusi intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 rasli su slabo u usporedbi s patohistološkim gradusom ATO. A značajno je povezan porast gradusa intenziteta ekspresije MMP-3 s porastom gradusa intenziteta ekspresije KIM-1 u biopsijama 6 mjeseci nakon transplantacije, $p < 0,002$ (Tablica 29).

Tablica 29. Povezanost između gradusa akutnog tubularnog oštećenja (ATO), gradusa ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 i gradusa ekspresije matriks-metaloproteinaze-3 u biopsijama 6 mjeseci nakon transplantacije.

Bx 6 mj		ATO gradus	KIM-1 gradus	MMP-3 gradus
ATO gradus	Pearson's r df p-vrijednost	- - -		
KIM-1 gradus	Pearson's r df p-vrijednost	0,069 19 0,765	- - -	
MMP-3 gradus	Pearson's r df p-vrijednost	0,193 19 0,402	0,621 20 0,002	- - -

* Bx 6 mj, biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije; ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks-metaloproteinaze-3. P vrijednost $< 0,05$, statistički značajna.

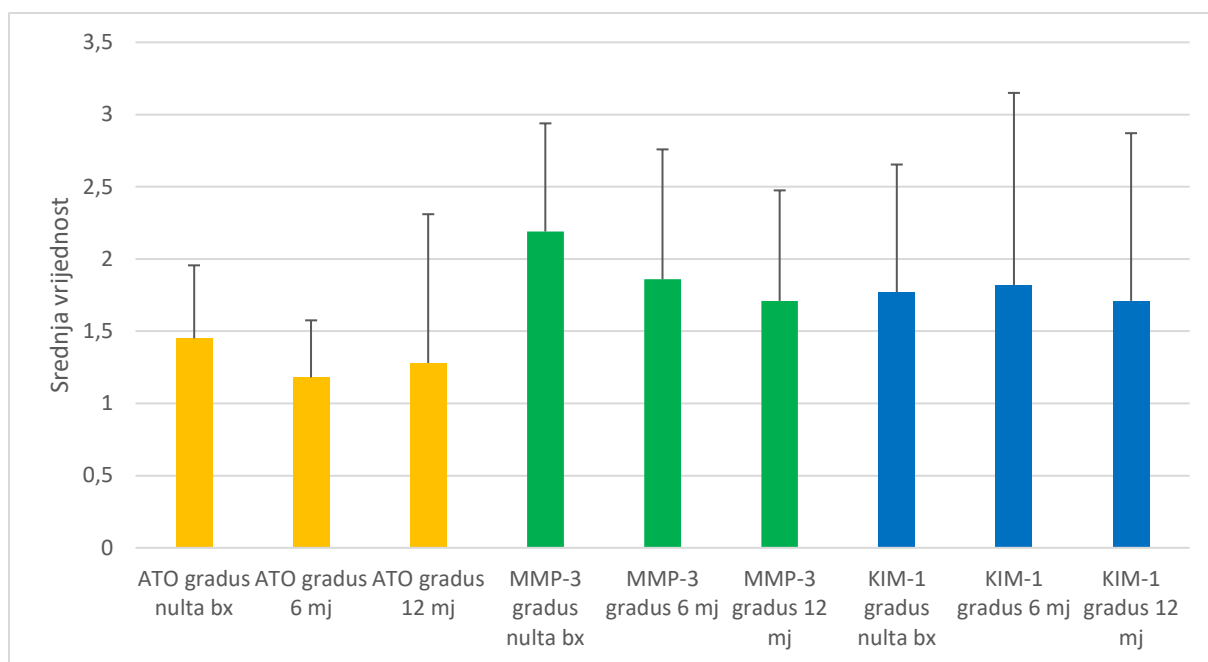
Usporedbom gradusa između parova ATO nulta biopsija i biopsija 12 mjeseci od transplantacije te uzorci biopsija uzetih 6 mjeseci od transplantacije i biopsija 12 mjeseci od transplantacije nije nađena značajna promjena vrijednosti gradusa akutnog oštećenja tubula.

Analizom snage korelacije prema Pearsonu gradus intenziteta ekspresije KIM-1 korelira s patohistološkim gradusom ATO, dok je povećanje gradusa intenziteta ekspresije MMP-3 bilo slabo povezano s padom patohistološkog gradusa ATO u biopsijama 12 mjeseci od transplantacije. Između gradusa intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 slaba je povezanost. Nema statistički značajnih povezanosti između analiziranih varijabli u biopsijama 12 mjeseci od transplantacije (Tablica 30) (Slika 15).

Tablica 30. Povezanost između gradusa akutnog tubularnog oštećenja (ATO), gradusa ekspresije molekule bubrežne ozljede-1 i gradusa ekspresije matriks-metaloproteinaze-3 u biopsijama 12 mjeseci nakon transplantacije.

Bx 12 mj		ATO gradus	KIM-1 gradus	MMP-3 gradus
ATO gradus	Pearson's r df p-vrijednost	- - -		
KIM-1 gradus	Pearson's r df p-vrijednost	0,169 13 0,548	- - -	
MMP-3 gradus	Pearson's r df p-vrijednost	-0,413 13 0,126	0,383 13 0,159	

* Bx 12 mj, biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije; ATO gradus, patohistološki gradus akutnog tubularnog oštećenja; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks-metaloproteinaze-3. P vrijednost <0,05, statistički značajna.



Slika 15. Parametri funkcije transplantiranih bubrega s primarnom funkcijom presatka. Srednje vrijednosti analiziranih parametara sa standardnim devijacijama u nultoj biopsiji, 6 mjeseci i 12 mjeseci nakon transplantacije. ATO, akutno tubularno oštećenje; bx, biopsija; KIM-1, molekula bubrežne ozljede-1; MMP-3, matriks-metaloproteinaza-3.

Pojavnost OFP-a bila je veća u presađaka s većim gradusom intersticijske upale u indikacijskim biopsijama 7 dana nakon transplantacije. Gradus intersticijske upale bio je značajno veći u biopsijama 7 dana nakon transplantacije u odnosu na biopsije 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije (Tablica 31).

Tablica 31. Promjene Banff skora intersticijskog upalnog infiltrata tijekom 12 mjeseci.

	p vrijednost
i bx0 – i OFP 7d bx	< ,001
i bx0 – i bx 6 mj	0,007
i bx0 – i bx 12 mj	0,034
i OFP 7d bx – i bx 6 mj	0,197
i OFP 7d bx – i bx 12 mj	0,061
i bx 6 mj – i bx 12 mj	0,545

*“i”, Banff skor intersticijskog upalnog infiltrata; bx0, nulta biopsija; OFP 7d bx, odgođena funkcija presatka biopsija 7 dan nakon transplantacije; bx 6 mj, biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije; bx 12 mj biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije. P vrijednost <0,05, statistički značajna.

Pojavnost OFP-a bila je veća u presađaka s većim Banff skorom tubulitisa u indikacijskim biopsijama 7 dana nakon transplantacije. Banff skorom tubulitisa bio je značajno veći u biopsijama 7 dana nakon transplantacije u odnosu na biopsije 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije (Tablica 32).

Tablica 32. Promjene Banff skora tubulitisa tijekom 12 mjeseci.

	p vrijednost
t bx0 – t OFP 7d bx	< ,001
t bx0 – t bx 6 mj	0,004
t bx0 – t bx 12 mj	0,013
t OFP 7d bx – t bx 6 mj	0,540
t OFP 7d bx – t bx 12 mj	0,294
t bx 6 mj – t bx 12 mj	0,661

*“t”, Banff skor tubulitisa; bx0, nulta biopsija; OFP 7d bx, odgođena funkcija presatka biopsija 7 dana nakon transplantacije; bx 6 mj, biopsija 6 mjeseci nakon

transplantacije; bx 12 mj, biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije. P vrijednost <0,05, statistički značajna.

Prema našim rezultatima nije utvrđena značajna statistička povezanost između OFP-a i Banff skora glomerulitisa među učinjenim biopsijama tijekom 12 mjeseci nakon transplantacije (Tablica 33).

Tablica 33. Promjene Banff skora glomerulitisa tijekom 12 mjeseci.

	p vrijednost
g bx 0 – g OFP 7d bx	1,000
g bx 0 – g bx 6 mj	1,000
g bx 0 – g bx 12 mj	0,163
g OFP 7d bx – g bx 6 mj	1,000
g OFP 7d bx – g bx 12 mj	0,163
g bx 6 mj – g bx 12 mj	0,163

*“g”, Banff skor glomerulitisa; bx0, nulta biopsija; OFP 7d bx, odgođena funkcija presatka biopsija 7 dana nakon transplantacije; bx 6 mj, biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije; bx 12 mj biopsija, 12 mjeseci nakon transplantacije. P vrijednost <0,05, statistički značajna.

Utvrđena je značajna razlika između gradusa intimalnog arteritisa u nultim biopsijama i indikacijskim biopsijama 7 dana nakon transplantacije ($p=0,010$) te značajna razlika gradusa intimalnog arteritisa između indikacijskih biopsija 7 dana nakon transplantacije i biopsijama 6 mjeseci nakon transplantacije ($p=0,010$). Pojavnost OFP bila je češća u presađakama bubrega s većim gradusom intimalnog arteritisa u biopsijama 7 dana nakon transplantacije (Tablica 34.).

Tablica 34. Promjene Banff skora intimalnog arteritisa tijekom 12 mjeseci.

	p vrijednost
v bx 0 – v OFP 7d bx	0,010
v bx 0 – v bx 6 mj	1,000
v bx 0 – v bx 12 mj	0,508
v OFP 7d bx – v bx 6 mj	0,010
v OFP 7d bx – v bx 12 mj	0,050
v OFP 7d bx – v bx 12 mj	0,508

* “v”, Banff skor intimalnog arteritisa; bx0, nulta biopsija; OFP 7d bx, odgođena funkcija presatka biopsija 7 dana nakon transplantacije; bx 6 mj, biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije; bx 12 mj biopsija, 12 mjeseci nakon transplantacije. P vrijednost $<0,05$, statistički značajna.

Postojala je statistički značajna razlika Banff skora intersticijske fibroze između biopsija 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije, u odnosu na nultu biopsiju. Pojavnost OFP-a bila je veća u presatcima s većim skorom intersticijske fibroze u biopsijama 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije (Tablica 35.).

Tablica 35. Promjene Banff skora intersticijske fibroze tijekom 12 mjeseci.

	p vrijednost
ci intersticijska fibroza bx 0 – ci OFP 7d bx	0,413
ci intersticijska fibroza bx 0 – ci bx 6 mj	< ,001
ci intersticijska fibroza bx 0 – ci bx 12 mj	< ,001
ci OFP 7d bx – ci bx 6 mj	< ,001
ci OFP 7d bx – ci bx 12 mj	< ,001
ci bx 6 mj – ci bx 12 mj	0,105

* “ci”, Banff skor intersticijske fibroze; bx0, nulta biopsija; OFP 7d bx, odgođena funkcija presatka biopsija 7 dana nakon transplantacije; bx 6 mj, biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije; bx 12 mj, biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije. P vrijednost <0,05, statistički značajna.

Postojala je statistički značajna razlika između Banff skora tubularne atrofije između učinjenih biopsija 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije u odnosu na nultu biopsiju, a pojavnost OFP-a bila je veća u presatcima s tubularnom atrofijom nakon 6 i 12 mjeseci (Tablica 36.).

Tablica 36. Promjene Banff skora intersticijske fibroze tijekom 12 mjeseci.

	p vrijednost
ct bx 0 – ct OFP 7d bx	0,313
ct bx 0 – ct bx 6 mj	0,002
ct bx 0 – ct bx 12 mj	< ,001
ct OFP 7d bx – ct bx 6 mj	0,031
ct OFP 7d bx – ct bx 12 mj	0,006
ct bx 6 mj - ct bx 12 mj	0,500

* “ct”, Banff skor tubularne atrofije; bx0, nulta biopsija; OFP 7d bx, odgođena funkcija presatka biopsija 7 dana nakon transplantacije; bx 6 mj, biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije; bx 12 mj biopsija, 12 mjeseci nakon transplantacije. P vrijednost <0.05, statistički značajna.

Gradusi intersticijske upale i gradusi tubulitisa značajno su se razlikovali između mjerenja učinjenih kod nultih biopsija i onih nakon 6 i 12 mjeseci.

Gradus glomerulitisa nije bio značajno različit u učinjenim biopsijama nakon 6 i 12 mjeseci u odnosu na nultu biopsiju.

Gradus intimalnog arteritisa značajno se razlikovao između učinjenih nultih biopsija i onih nakon 6 i 12 mjeseci.

Gradusi intersticijske fibroze i tubularne atrofije značajno su se razlikovali između mjerenja učinjenih kod nultih biopsija i onih nakon 6 i 12 mjeseci (Tablica 37).

Tablica 37. Promjene analiziranih Banff skorova tijekom 12 mjeseci.

Banff skor	χ^2	df	p
i	14,1	3	0,003
t	12,6	3	0,006
g	3,00	3	0,392
v	8,60	3	0,035
ci	27,5	3	<0,001
ct	15,7	3	0,001

* “i”, Banff skor intersticijske upale; “t”, Banff skor tubulitisa; “g”, Banff skor glomerulitisa; “v”, Banff skor intimalnog arteritisa; “ci”, Banff skor intersticijske fibroze; “ct”, Banff skor tubularne atrofije; p vrijednost <0,05 statistički značajna.

Analiziran je ukupno 31 uzorak transplantiranog bubrega u kojem je tijekom 12 mjeseci patohistološkom analizom utvrđeno granično i akutno stanično odbacivanje. Utvrđeno je da su svi promatrani parametri (gradusi intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 te gradus vrijednosti eGFR) bili nepravilno distribuirani (Shapiro-Wilk test) (Tablica 38).

Tablica 38. Karakteristike skupine uzoraka transplantiranih bubrega s graničnim i akutnim staničnim odbacivanjem.

	KIM-1 gradus 7 dana bx	MMP-3 gradus 7 dana bx	eGFR gradus 7 dana bx	KIM-1 gradus 6 mj bx	MMP-3 gradus 6 mj bx	eGFR gradus 6 mj bx	KIM-1 gradus 12 mj bx	MMP-3 gradus 12 mj bx	eGFR gradus 12 mj bx
N	10	10	6	9	9	9	12	12	12
N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Srednja vrijednost	1,50	1,40	4,5	1,33	1,22	2,89	2,67	2,17	2,58
Medijan	1,0	1,0	5,0	1,0	1,0	3,0	2,5	2,0	3,0
Standardna devijacija	0,707	0,699	0,837	0,707	0,441	0,782	0,985	0,712	0,668
Minimum	1	1	3	0	1	2	1	1	1
Maksimum	3	3	5	2	2	4	4	3	3
Shapiro- Wilk p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

* N, broj uzoraka biopsija transplantiranih bubrega; 7 dana bx, biopsija 7 dana nakon transplantacije; 6 mj bx, biopsija 6 mjeseci nakon transplantacije; 12 mj bx, biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks metaloproteinaze-3; eGFR gradus, gradus vrijednosti procijenjene glomerulske filtracije; P vrijednost <0,05, statistički značajna; N/A, nije analizirano.

Prema rezultatima analize promjene vrijednosti gradusa intenziteta ekspresije KIM-1 i MMP-3 sa skorovima akutnih promjena, intersticijskim upalnim infiltratom i tubulitisom te promjene gradusa eGFR u transplantiranim bubrezima s akutnim bubrežnim odbacivanjem utvrđeno je statistički značajno poboljšanje bubrežne funkcije te porast gradusa MMP-3 i KIM-1 nakon 12 mjeseci. Vrijednost skora intersticijske upale i tubulitisa nije se razlikovao u praćenju ispitanika po mjesecima (Tablica 39).

Tablica 39. Usporedba parova prema vremenima uzorkovanja transplantiranih bubrega s graničnim i akutnim staničnim odbacivanjem.

	χ^2	df	p
Skor „i“	2,37	2	0,306
Skor „t“	0,18	2	0,914
KIM-1 gradus	8,69	2	0,013
MMP-3 gradus	9,69	2	0,008
eGFR gradus	14,56	2	<0,001

* Skor “i”, Banff skor intersticijskog upalnog infiltrata; Skor “t”, Banff skor tubulitisa; KIM-1 gradus, gradus intenziteta ekspresije molekule bubrežne ozljede-1; MMP-3 gradus, gradus intenziteta ekspresije matriks metaloproteinaze-3; eGFR gradus, gradus vrijednosti procijenjene glomerulske filtracije; p vrijednost <0,05, statistički značajna

5 RASPRAVA

Molekula bubrežne ozljede-1 je transmembranski glikoprotein izražen na preživjelim dediferenciranim epitelnim stanicama proksimalnih tubula bubrega nakon ishemijskog oštećenja. U brojnim radovima je dokazano da ekstracelularna domena proteina KIM-1 ima ulogu u staničnoj adheziji i fagocitozi ostataka apoptotskih i nekrotičnih stanica. Na taj način sudjeluju u uklanjanju opstrukcije lumena tubula.

U fazi regeneracije, nakon ishemijskog oštećenja, matriks metaloproteinaza-3 (MMP-3) sudjeluje u mehanizmima odvajanja ektodomene KIM-1 te posreduje u aktiviranju i migraciji preživjelih dediferenciranih stanica na ogoljela mjesta bazalne membrane i time obnavljaju kontinuirani epitelni sloj (5, 6, 89, 92)

Akutno oštećenje presatka bubrega i akutno odbacivanje često nisu pravovremeno prepoznati te je dugoročno preživljenje presatka uz te komplikacije nezadovoljavajuće. Zbog postupnog kroničnog propadanja funkcije koje rezultira gubitkom presatka bubrega potrebna je rana procjena funkcije i pravodobno liječenje akutnog oštećenja i akutnog odbacivanja presatka bubrega

Potrebno je razjasniti ulogu KIM-1 i MMP-3 u ishemijsko reperfuzijskom oštećenju transplantiranog bubrega radi pravovremenog prepoznavanja akutnog tubularnog oštećenja i akutnog odbacivanja, omogućavanju brzog procesa regeneracije tubula i uspostavljanja funkcije presatka bubrega te dugoročnog preživljenja.

Većina dosadašnjih studija proučavala je urinarne i serumske razine KIM-1, te ekspresiju na površini kultura stanica humanih i mišjih stanica proksimalnih tubula.

Prema našim spoznajama ovo je prva studija koja proučava ekspresiju KIM-1 i MMP-3 na uzorcima biopsija transplantiranih bubrega od nulte biopsije do biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije. Analizirali smo povezanost povišenih ekspresija molekula KIM-1 i MMP-3 s gradusom akutnog tubularnog oštećenja i vrijednosti kreatinina u serumu.

Statističkom analizom dobivenih podataka potvrdili smo da su korelacije između gradusa vrijednosti KIM-1 i MMP-3 statistički značajne do uzorka 6 mjeseci nakon trasnsplantacije.

Oporavak tubula možemo pratiti analizom gradusa akutnog tubularnog oštećenja i vrijednostima kreatinina u serumu tijekom 12 mjeseci nakon transplantacije.

Ekspresija KIM-1 korelira sa stupnjem akutnog oštećenja tubula, tubulointersticijskom upalom i fibrozom i jedan je od najboljih pokazatelja funkcije presatka bubrega 6 mjeseci od transplantacije (7, 96, 97, 99, 100).

U radu koji je objavio Humphreys promatrana je kronična ekspresija KIM-1 na imortaliziranim stanicama koja je rezultirala tubularnom intersticijskom fibrozom i upalom (88).

Do sada je objavljen mali broj radova o MMP-3 na transplantiranim bubrezima te je cilj našeg istraživanja bio bolje upoznati ulogu MMP-3 u ishemijskom oštećenju i regeneraciji presatka bubrega.

Lim i suradnici su prvi dokazali da MMP-3 posreduje u procesu odvajanja ektodomene KIM-1 sa stanica proksimalnih tubula u primarnim humanim staničnim kulturama. Također su na mišjem pokusnom modelu ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja analizirali ekspresiju KIM-1 i MMP-3 na stanicama proksimalnih tubula. Time su pružili in vitro i in vivo dokaze da je MMP-3 odgovorna za odvajanje KIM-1 (9).

Rodrigo i suradnici su mjerili koncentraciju MMP-2 i MMP-3 u serumu nakon transplantacije bubrega kod kojih se razvila kronična nefropatija. Objavili su rezultate koji potvrđuju da su povišene serumske koncentracije proMMP-3 u pozitivnoj korelaciji s vrijednostima kreatinina u serumu i da su također povišene u bubrezima s epizodom akutnog odbacivanja (103).

Bonventre je naveo ulogu matriks metaloproteinaza u proteolizi tubularnih stanica tijekom akutnog ishemijsko-reperfuzijskog (I/R) oštećenja u bubregu (2).

Ulogu matriks metaloproteinaza u I/R oštećenju potvrdilo je nekoliko studija, uključujući nalaz da su MMP-2 i -9 povišene u renalnim tubulima i u intersticiju nakon 1-3 dana od I/R oštećenja kod štakora.

Matriks metaloproteinaza-3 je eksprimirana u ljudskom bubregu u glomerulu i u nekim tubularnim epitelnim stanicama (106).

Punsawad i suradnici su 2017.g. objavili rezultate analize ekspresije KIM-1 i MMP-3 na tkivima akutno oštećenih bubrega pacijenata preminulih od malarije. Bila je prisutna značajna pozitivna korelacija između ukupnog skora ekspresije KIM-1 i akutne tubularne nekroze te ekspresije MMP-3 (102).

Prikazali smo analizu ekspresije MMP-3 u nultim biopsijama, te 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije. Analizirali smo da li postoji povezanost ekspresije MMP-3 i ekspresije KIM-1.

Nulte biopsije (n=31) podijelili smo u dvije skupine: s primarnom funkcijom presatka (n=17) i s odgođenom funkcijom presatka, (n=14). Podjednake su srednje vrijednosti gradusa ekspresije KIM-1 (2,00 vs. 1,58) i gradusa ekspresije MMP-3 (2,05 vs. 2,32) u obje skupine nultih biopsija uz podjednake srednje vrijednosti i gradusa ATO (1,55 vs. 1,71).

U uzorcima svih nultih biopsija srednja vrijednost gradusa ekspresije KIM-1 bila je 1,77, srednja vrijednost gradusa ekspresije MMP-3 bila je 2,19, a gradus ATO imao je srednju vrijednost 1,45. uz nepravilnu distribuciju prema Shapiro Wilk testu.

Analizom uzoraka nultih biopsija po Mann-Whitney U testu: uzorci nultih biopsija presadaka bubrega koji su imali lošije tj više graduse akutnog tubularnog oštećenja imali su značajno više vrijednosti kreatinina ($p=0,031$) i niže vrijednosti eGFR-a u odnosu na uzorke s nižim gradusom akutnog tubularnog oštećenja ($p=0,008$), dok kod gradusa ekspresije KIM-1 ($p=0,115$) i ekspresije MMP-3 ($p=0,322$) nisu primijećene razlike.

Usporedbom parova po Durbin-Conover analizi gradus akutnog tubularnog oštećenja značajno je niži tijekom analize u biopsiji uzetoj 6 mjeseci nakon transplantacije ($p=0,003$) u usporedbi s analizom težine oštećenja u nultoj biopsiji te se može zaključiti da je došlo do značajnog oporavka strukture tubula.

Prema Pearson r pokazatelju KIM-1 i MMP-3 gradusi vrlo slabo rastu s gradusom akutnog oštećenja tubula, dok je povećanje MMP-3 gradusa ekspresije povezano s povećanjem KIM-1 gradusa ekspresije u biopsijama 6 mjeseci nakon

transplantacije. Statistički je prisutna značajna povezanost između gradusa KIM-1 i MMP-3, $p < 0,002$.

Usporedbom gradusa između parova ATO nulta biopsija i biopsija 12 mjeseci od transplantacije ($p = 0,075$) te između uzoraka biopsija uzetih 6 mjeseci od transplantacije i biopsija 12 mjeseci od transplantacije ($p = 0,176$) nije nađena značajna promjena vrijednosti gradusa akutnog oštećenja tubula.

Nije bilo statistički značajnih korelacija (Pearson r) između analiziranih varijabli KIM-1, ATO i MMP-3 u biopsijama 12 mjeseci nakon transplantacije.

Naša studija potvrđuje analizom ekspresije imunohistokemijskog bojenja da je KIM-1 i MMP-3 ekspresija nađena u stanicama proksimalnih tubula s akutnim bubrežnim oštećenjem.

Prema cilju analize odgođene funkcije presatka pratili smo promjenu ekspresije KIM-1 i MMP-3 unutar 7 dana od transplantacije u uzorcima presađaka s akutnim tubularnim oštećenjem kod kojih se razvila OFP.

Schröppel i sur. su u prvoj prospektivnoj studiji analizirali povezanost ekspresije KIM-1 u preimplantacijskim biopsijama s funkcijom transplantiranog bubrega. Nisu pronašli pozitivnu korelaciju između ekspresije KIM-1 i pojave OFP, no ekspresija KIM-1 imala je značajnu pozitivnu korelaciju sa stupnjem intersticijske fibroze (92).

Analizom povezanosti parametara u nultim biopsijama presađaka koji su razvili epizodu OFP nije uočena statistički značajna povezanost između analiziranih varijabli: navedi varijable i vrijednosti.

Wilcoxonovim testom analizirali smo da li je prisutna povezanost između promjena parametara nultih biopsija i biopsija 7 dana nakon transplantacije uzoraka s OFP. U učinjenim biopsijama nakon 7 dana presađci bubrega s OFP su imali značajno veće graduse eGFR-a (5,0 vs. 3,5), intersticijska upala (1 vs. 0), tubulitis (1 vs. 0) te niže graduse ekspresije MMP-3 (medijan je isti = 2, no prosjeci su 1,89 vs. 2,39). U ostalim promatranim parametrima nisu pronađene razlike između nultih i biopsija 7 dana nakon transplantacije, u uzorcima bubrega s OFP.

Analizirali smo povezanost parametara u biopsijama presađaka bubrega s OFP uzorkovanim 7 dana nakon transplantacije. Gradus ekspresije MMP-3 bio je

značajno viši s povećanjem ATO gradusa, dok nije bilo statistički značajnih razlika u povezanosti ostalih varijabli u biopsijama koje varijable i vrijednosti.

Gradus intersticijske fibroze bio je značajno različit između učinjenih biopsija nakon 6 i 12 mjeseci u odnosu na nultu biopsiju. Pojavnost OFP-a bila je veća u bolesnika s većim gradusom intersticijske fibroze u biopsiji nakon 7 dana te nakon 6 i 12 mjeseci.

Ponavljajuća mjerenja ANOVA (neparametrijska): Gradus tubularne atrofije značajno se razlikovao između učinjenih nultih biopsija i onih nakon 6 i 12 mjeseci.

Usporedba parova (Durbin-Conover): Postojala je značajna razlika između gradusa tubularne atrofije između učinjenih biopsija nakon 6 i 12 mjeseci u odnosu na nultu, a pojavnost OFP-a bila je veća u ispitanika s tubularnom atrofijom nakon 6 i 12 mjeseci.

Malyszko i sur. analizirali su povezanost ekspresije urinarnog KIM-1 s funkcijom presatka bubrega. I uspješna transplantacija bubrega povezana je s oštećenjem bubrega, što se očituje s povišenim urinarnim KIM-1 i niskom eGFR (85).

Song i sur. (97) su istražili ekspresiju molekule KIM-1 u biopsijama transplantiranih bubrega i potvrdili su značaj ekspresije molekule KIM-1 kao biomarkera u akutnom oštećenju bubrega. Odabrali su 52 uzorka s povišenim vrijednostima kreatinina u serumu. Ekspresija KIM-1 pozitivno je korelirala s težinom upalnih promjena tubula bubrega u akutnom staničnom odbacivanju. Uzorke biopsija rasporedili su u skupine prema Banff kriterijima: skupina s akutnim staničnim odbacivanjem, skupina s kroničnim aktivnim humoralnim odbacivanjem, skupina s kroničnim aktivnim staničnim odbacivanjem te skupina s graničnim lezijama/odbacivanjem. Rezultati njihovog istraživanja ukazuju na značajnu korelaciju ekspresije KIM-1 i vrijednosti kreatinina u serumu ($p=0,0028$). Snažna ekspresija KIM-1 detektirana je u 66,7% bubrežnog uzorka u akutnom staničnom odbacivanju, u 88,9% bubrežnog uzorka s kroničnim odbacivanjem i u 30,8% bubrežnog tkiva s graničnim lezijama.

Zhang i sur. (8) su analizirali povezanost vrijednosti parametara funkcije bubrega s ekspresijom proteina KIM-1 u biopsijama transplantiranih bubrega. Prema histološkom nalazu podijelili su uzorke biopsija transplantiranih bubrega u tri skupine: skupina jedan su bile protokolarne biopsije bez histološkog nalaza ATO, u drugoj skupini su bile biopsije u kojima je uočeno ATO te treća skupina biopsija u kojima je histološki nađeno ACR. Parametre funkcije bubrega, kreatinin i ureju u serumu te eGFR analizirali su na dan biopsije, a zatim 6, 12 i 18 mjeseci nakon biopsije. Vrijednosti kreatinina i ureje u serumu bile su značajno povišene a eGFR zatno niža u skupinama s ATO i ACR u suporedbi s grupom bez histološki dokazanog ATO. Uzorci biopsija presađaka bubrega koji su na dan biopsije imali razine ekspresije KIM-1 (2+ ili 3+) imali su bolji oporavak funkcije tijekom vremena, redukciju kreatinina i porast eGFR.

Smatra se da su visoke razine ekspresije KIM-1 dobar prognostički znak. Razlog smanjenja funkcije bubrega bio je akutni i uključuje tubule koji su u mogućnosti stvarati obilnu ekspresiju KIM-1 receptora. Transplantirani bubrezi s niskim vrijednostima ekspresije KIM-1 možda odražavaju više kronične promjene i time manju reverzibilnost funkcije.

Šimić Ogrizović i sur. su u retrospektivnoj studiji proučavali važnost ekspresije KIM-1 u predviđanju bubrežne funkcije u raznim bolestima bubrega tijekom tri godine nakon biopsije bubrega. U studiji je pokazana snažna povezanost između ekspresije KIM-1 i tubulointersticijske upale i fibroze, ali nije zabilježena povezanost ekspresije KIM-1 i tubulointersticijske atrofije. Ekspresija KIM-1 bila je najbolji prediktor za funkciju bubrega 6 mjeseci nakon biopsije bubrega (93).

Kod akutnog bubrežnog oštećenja postoji rizik za razvoj kronične bubrežne bolesti. Pretpostavlja se da je mehanizam prijelaza iz akutnog oštećenja u kroničnu bubrežnu bolest povezan s poremećenim procesom cijeljenja u koji su uključene epitelne stanice tubula, fibroblasti, miofibroblasti, fibrociti i imunološke stanice (93).

Nogare i suradnici (89) su proučavali ekspresiju mRNA molekule KIM-1 te ekspresiju KIM-1 u epitelnim stanicama proksimalnih tubula transplantiranih bubrega s patohistološkom dijagnozom intersticijske fibroze i tubularne atrofije.

Uzorke biopsija podijelili su po skupinama u kojima je izraženo akutno tubularno oštećenje, akutno odbacivanje, skupina s nefrotoksičnosti kalcineurinskim inhibitorom te skupina s intersticijskom fibrozom i tubularnom atrofijom. Gradusi imunohistokemijskog obojenja KIM-1 2+ i 3+ bili su prisutni u 50% uzoraka s IF/TA, u usporedbi s 11%, 22% i 25% u CIN, ATN i AR. Medijan ekspresije KIM-1 u skupini s IF/TA bio je (1,5 (1,0-2,0)) to je znatno više u usporedbi s ekspresijom u skupini s ATO (1,0 (0,0-1,50)), u skupini s akutnim odbacivanjem (1,0 (1,0-2,0)) ili akutnom nefrotoksičnošću (0 (0,0-0,0)) ($P=0,012$).

Prema Lai i sur. glavni okidač za kroničnu upalu je kontinuirani stanični i humoralni aloimuni odgovor u presatku koji vodi do upale tubulointersticija i progresivnog sužavanja krvnih žila presatka (77).

Naši rezultati analize povezanosti skorova akutnih parametara intersticijske upale i tubulitisa u skupini transplantiranih bubrega s epizodom OFP bili su veći u biopsijama 7 dana nakon transplantacije nego nakon 6 i 12 mjeseci.

Analizirali smo povezanost odgođene funkcije transplantiranih bubrega s razvojem kroničnih promjena parenhima bubrega, intersticijske fibroze (ci) i tubularne atrofije (ct). Prema našim podacima gradusi intersticijske fibroze bili su značajno različiti u analizi uzoraka biopsija 7 dana OFP i biopsija 6 mjeseci ($p<0,001$) i 12 mjeseci ($p<0,001$) nakon transplantacije bubrega. Istom analizom po Durbin-Conoveru, gradusi tubularne atrofije bili su značajno različiti u analizi uzoraka biopsija 7 dana OFP i biopsija 6 mjeseci ($p=0,031$) i 12 mjeseci ($p<0,006$) nakon transplantacije bubrega.

Cilj nam je bila analiza intenziteta ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 u skupini uzoraka biopsija presađaka bubrega s graničnim i akutnim staničnim odbacivanjem prema Banff kriterijima.

Johnson i suradnici su analizom ekspresije KIM-1 na stanicama proksimalnih tubula u skupinama s akutnim tubularnim oštećenjem i akutnim humoralnim odbacivanjem presatka potvrdili dobivenim rezultatima da je akutno oštećenje tubula važna sastavnica akutnog humoralnog odbacivanja. U skupini s akutnim oštećenjem tubula intenzitet ekspresije bio je od 1+ do 3+, a u skupini s akutnim humoralnim odbacivanjem intenzitet ekspresije bio je od 0,5+ do 3+ (90).

Prema našim podacima, usporedbom gradusa procijenjene glomerularne filtracije u uzorcima s akutnim bubrežnim odbacivanjem 12 mjeseci nakon transplantacije utvrđeno je statistički značajno poboljšanje bubrežne funkcije ($p < 0,001$). Srednja vrijednost eGFR u uzorcima 7 dana nakon transplantacije bila je 4,5 a u uzorcima 12 mjeseci nakon transplantacije srednja vrijednost bila je 2,58. Analizirana je ekspresija molekule KIM-1 u biopsijama s akutnim staničnim odbacivanjem. Uočen je statistički značajan porast gradusa intenziteta ekspresije molekule KIM-1 u biopsijama s ACR 12 mjeseci nakon transplantacije ($p = 0,013$) te statistički značajan porast gradusa ekspresije MMP-3 ($p = 0,008$). Gradusi intersticijske upale (i) i tubulitisa (t) nisu se značajno razlikovali od nulte biopsije pa sve do biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije.

Srednja vrijednost gradusa ekspresije molekule KIM-1 u biopsiji 7 dana nakon transplantacije bila je 1,50 a srednja vrijednost gradusa ekspresije molekule MMP-3 bila je 1,40. Za usporedbu, srednje vrijednosti gradusa ekspresija 12 mjeseci nakon transplantacije bili su za KIM-1 2,67, a za MMP-3 2,17.

Porast ekspresije MMP-3 može predvidjeti ACR i time može poslužiti kao koristan biomarker za akutno odbacivanje i disfunkciju bubrega.

Analizirali smo povezanost odgođene funkcije transplantiranih bubrega s razvojem kroničnih promjena parenhima bubrega, intersticijske fibroze (ci) i tubularne atrofije (ct). Usporedbom parova po Durbin-Conoveru gradusi intersticijske fibroze bili su značajno različiti u analizi uzoraka biopsija 7 dana OFP i biopsija 6 mjeseci ($p < 0,001$) i 12 mjeseci ($p < 0,001$) nakon transplantacije bubrega. Istom analizom po Durbin-Conoveru, gradusi tubularne atrofije bili su značajno različiti u analizi uzoraka biopsija 7 dana OFP i biopsija 6 mjeseci ($p = 0,031$) i 12 mjeseci ($p < 0,006$) nakon transplantacije bubrega.

Siedlecki i sur. (13) su metaanalizom 34 studije dobili rezultate da su pacijenti s OFP imali 49% veću incidenciju akutnog odbacivanja u usporedbi sa 35% incidencijom kod pacijenata bez OFP.

Prema analizi funkcije 834 presatka Giral-Classe i sur. (48) došli su do zaključka da OFP koja traje dulje od 6 dana izrazito smanjuje dugoročno preživljenje presadaka.

Patohistološki nalaz biopsije presaka s OFP, koje su proveli Castro Filho i sur. (49) govori da je u 42,1% pronađeno ATN, u 26,9% akutno odbacivanje te u 25,5% granično akutno odbacivanje.

U preglednom članku Ponticelli i sur. (53) su analizom presadaka bubrega iznijeli podatke da najveći utjecaj na OFP imaju težina IRI, kvaliteta presatka uz posttransplantacijsko razdoblje.

Donnelly i sur. (51) su proučavali po skupinama razna vremena trajanja OFP i korelaciju s funkcijom presatka tj vrijednosti kreatinina u serumu te zaključili da slaba funkcija presatka u OFP može biti odraz težine IRI. Sporija regeneracija tubula nakon AKI vodi u fibrozu. Postavili su hipotezu da dužina trajanja OFP ovisi o težini IRI i o kvaliteti presatka. Slične je rezultate s dužim OFP dobio i Phillips nakon analize podataka prikupljenih u registru Velike Britanije o transplantiranim bubrezima. Kratka odgođena funkcija presatka ne utječe na dugoročno preživljenje kao OFP koja traje duže od 2 tjedna (52).

Ovo je prva retrospektivna studija koja analizira korelacije ekspresije KIM-1 i MMP-3 u epizodama OFP i ACR u biopsijama transplantiranih bubrega, i prati oporavak funkcije mjerenjem eGFR u prvih 12 mjeseci nakon transplantacije.

Nakon transplantacije odgođena funkcija presatka je rani pokazatelj kvalitete bubrega, trajanja ishemije te djelovanja upale i imunološkog odgovora na transplantirani organ.

Ovim istraživanjem smo planirali definirati povezanost težine ATO i ekspresije KIM-1 i MMP-3 kao potencijalnih biomarkera oštećenja bubrega te vjerojatnosti za razvoj OFP i ACR te mogućnosti oporavka strukture i funkcije bubrega.

Biopsije u kojima je histološki dokazano granično akutno stanično odbacivanje i akutno stanično odbacivanje prema Banff kriterijima također su analizirane na SCr te ekspresije KIM-1 i MMP-3 te su primijećene statistički značajne promjene ekspresije i korelacije.

Ograničenja našeg istraživanja su relativno malen broj uzoraka bubrega i vremensko razdoblje od samo 12 mjeseci u kojem je praćena funkcija bubrega.

6 ZAKLJUČAK

Ovom disertacijom ostvarili smo doprinos u boljem razumijevanju povezanosti ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 u transplantiranim bubrezima nakon I/R oštećenja. Dobiveni rezultati omogućit će bolje razumijevanje patofiziološke uloge proteina KIM-1 i MMP-3 u akutnom I/R oštećenju bubrega te oporavku strukture i funkcije humanih bubrega.

1. Uzorci nultih biopsija presađaka bubrega koji su imali više patohistološke graduse ATO imali su značajno povišene graduse koncentracije kreatinina u serumu i niže vrijednosti eGFR-a u odnosu na uzorke s nižim patohistološkim gradusom ATO, dok kod ekspresije KIM-1 i MMP-3 nisu primijećene značajne razlike.

2.

U skupini transplantiranih bubrega s OFP, u uzorcima 7 dana nakon transplantacije gradusi ekspresije MMP-3 bili su značajno viši s povećanjem patohistološkog gradusa ATO.

3. U prvih 6 mjeseci nakon transplantacije značajna je povezanost između gradusa ekspresija KIM-1 i MMP-3 te gradusa koncentracije serumskog kreatinina.

4. U razdoblju od 6 mjeseci pa do 12 mjeseci nakon transplantacije nije nađena značajna razlika u promjeni gradusa ekspresije proteina KIM-1 i MMP-3 te u gradusima koncentracije kreatinina u serumu.

5. Pojavnost intersticijske fibroze i tubularne atrofije je veća u skupini presađaka koji su imali epizodu OFP, zabilježeni su veći gradusi intersticijske fibroze i tubularne atrofije u biopsijama 7 dana nakon transplantacije bubrega te nakon 6 i 12 mjeseci nakon transplantacije.

6. Prisutno je poboljšanje bubrežne funkcije: smanjenje gradusa koncentracije kreatinina, porast eGFR te porast ekspresije proteina MMP-3 i KIM-1 u uzorcima s akutnim staničnim odbacivanjem 12 mjeseci nakon transplantacije. Porast ekspresije MMP-3 može predvidjeti ACR i time može poslužiti kao koristan biomarker za akutno odbacivanje i disfunkciju bubrega.

7. Budući da je ekspresija KIM-1 bila značajno povišena nakon I/R oštećenja u nultim biopsijama transplantiranih bubrega u odnosu na zanemarivo malu ekspresiju u zdravim bubrezima, KIM-1 može poslužiti kao biomarker u proučavanju mehanizma AKI i regeneracije bubrega.

7 LITERATURA

1. Guyton A. C, Hall J. E. (2012) Medicinska fiziologija. 12. izd. Medicinska naklada, Zagreb.
2. Bonventre, J. V., & Yang, L. (2011). , »Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. The Journal of clinical investigation, 121(11), 4210–4221.
3. Kasper D. L, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, i sur., (2008) Harrison's principles of internal medicine (17th ed.). New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division.
4. Devarajan P. (2006)., »Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 17(6), 1503–1520.
5. Reichel R. R. (2014)., »Acute kidney injury: quoi de neuf?. Ochsner journal, 14(3), 359–368.«.
6. Ichimura, T., Asseldonk, E. J., Humphreys, B. D., Gunaratnam, L., Duffield, J. S., & Bonventre, J. V. (2008)., »Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. The Journal of clinical investigation, 118(5), 1657–1668.
7. Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L., & Sanicola, M. (1998). , »Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. The Journal of biological chemistry, 273(7), 4135–4142.
8. Zhang, P. L., Rothblum, L. I., Han, W. K., Blasick, T. M., Potdar, S., & Bonventre, J. V. (2008). , »Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. Kidney international, 73(5), 608–614.
9. Lim, A. I., Chan, L. Y., Lai, K. N., Tang, S. C., Chow, C. W., Lam, M. F., & Leung, J. C. (2012)., »Distinct role of matrix metalloproteinase-3 in kidney injury molecule-1 shedding by kidney proximal tubular epithelial cells. The international journal of biochemistry & cell biology, 44(6), 1040–1050.

10. Ahmed, A. K., El Nahas, A. M., & Johnson, T. S. (2012). , »Changes in matrix metalloproteinases and their inhibitors in kidney transplant recipients. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 10(4), 332–343.
11. Heilman, R. L., Devarapalli, Y., Chakkerla, H. A., Mekeel, K. L., Moss, A. A., Mulligan, D. C., Mazur, M. J., Hamawi, K., Williams, J. W., & Reddy, K. S. (2010)., »Impact of subclinical inflammation on the development of interstitial fibrosis and tubular atrophy in kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 10(3), 563–570.
12. Nankivell, B. J., & Chapman, J. R. (2006)., »The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(9), 2006–2012.
13. Siedlecki, A., Irish, W., & Brennan, D. C. (2011)., »Delayed graft function in the kidney transplant. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(11), 2279–2296.
14. Prkačin I, (2019) Prijebubrežno akutno oštećenje bubrega. Akutno oštećenje bubrega, Medicinska naklada, Zagreb, Poglavlje 10, str. 121-131.
15. Waring, W. S., & Moonie, A. (2011)., »Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 49(8), 720–728.
16. Desanti De Oliveira, B., Xu, K., Shen, T. H., Callahan, M., Kiryluk, K., D'Agati, V. D. i sur., (2019). , »Molecular nephrology: types of acute tubular injury. *Nature reviews. Nephrology*, 15(10), 599–612.
17. Kes P. i sur. (2019) Akutno oštećenje bubrega, Medicinska naklada Zagreb.
18. Nørgård, M. Ø., & Svenningsen, P. (2023)., »Acute Kidney Injury by Ischemia/Reperfusion and Extracellular Vesicles. *International journal of molecular sciences*, 24(20), 15312.

19. Makris, K., & Spanou, L. (2016)., »Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. The Clinical biochemist. Reviews, 37(2), 85–98.«.
20. Moledina, D. G., Obeid, W., Smith, R. N., Rosales, I., Sise, M. E., Moeckel, G. i sur., »Identification and validation of urinary CXCL9 as a biomarker for diagnosis of acute interstitial nephritis. The Journal of clinical investigation, 133(13), e168950.
21. Junqueira C. L, Carneiro J, (2005) Osnove histologije, Školska knjiga, Zagreb.
22. Martini, A. G., & Danser, A. H. J. (2017)., »Juxtaglomerular Cell Phenotypic Plasticity. High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension, 24(3), 231–242.
23. Famulski, K. S., de Freitas, D. G., Kreepala, C., Chang, J., Sellares, J., Sis, B., i sur. (2012). Molecular phenotypes of acute kidney injury in kidney transplants. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 23(5), 948–958.
24. Schrier, R. W., Wang, W., Poole, B., & Mitra, A. (2004)., »Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. The Journal of clinical investigation, 114(1), 5–14.
25. Oppong, Y. D., Farber, J. L., Chervoneva, I., & Martinez Cantarin, M. P. (2016). Correlation of acute tubular injury in reperfusion biopsy with renal transplant outcomes. Clinical transplantation, 30(7), 836–844.
26. Hall, A. M., & Schuh, C. D. (2016). Mitochondria as therapeutic targets in acute kidney injury. Current opinion in nephrology and hypertension, 25(4), 355–362.
27. Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. International review of cell and molecular biology, 298, 229–317.
28. Tögel, F., & Westenfelder, C. (2014). , »Recent advances in the understanding of acute kidney injury. F1000prime reports, 6, 83.

29. Patschan, D., Patschan, S., & Müller, G. A. (2012)., »Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. *Journal of transplantation*, 2012, 764154.
30. Gwinner, W., Hinzmann, K., Erdbruegger, U., Scheffner, I., Broecker, V., Vaske, B., i sur. (2008). Acute tubular injury in protocol biopsies of renal grafts: prevalence, associated factors and effect on long-term function. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8(8), 1684–1693.
31. Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011)., »Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine*, 17(11), 1391–1401.
32. Basile, D. P., & Yoder, M. C. (2014)., »Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*, 14(1), 3–14.
33. Salvadori, M., Rosso, G., & Bertoni, E. (2015). Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World journal of transplantation*, 5(2), 52–67.
34. Ponticelli C. (2014)., »Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 29(6), 1134–1140.
35. Paller, M. S., Hoidal, J. R., & Ferris, T. F. (1984)., »Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *The Journal of clinical investigation*, 74(4), 1156–1164.
36. Forbes, J. M., Hewitson, T. D., Becker, G. J., & Jones, C. L. (2000). , »Ischemic acute renal failure: long-term histology of cell and matrix changes in the rat. *Kidney international*, 57(6), 2375–2385.
37. Ferenbach, D. A., & Bonventre, J. V. (2016)., »Acute kidney injury and chronic kidney disease: From the laboratory to the clinic. *Nephrologie & therapeutique*, 12 Suppl 1(Suppl 1), S41–S48.
38. Lisowska-Myjak B. (2010)., »Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood purification*, 29(4), 357–365.

39. K, Solez, »Racusen LC. The Banff classification revisited,« *Kidney Int.*, 2013 Feb.
40. Haas, M., Montgomery, R. A., Segev, D. L., Rahman, M. H., Racusen, L. C., Bagnasco, S. M., i sur. (2007)., »Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(3), 576–585.
41. Loupy, A., Mengel, M., & Haas, M. (2022)., »Thirty years of the International Banff Classification for Allograft Pathology: the past, present, and future of kidney transplant diagnostics. *Kidney international*, 101(4), 678–691.
42. Koo, D. D., Welsh, K. I., Roake, J. A., Morris, P. J., & Fuggle, S. V. (1998)., »Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. *The American journal of pathology*, 153(2), 557–566.
43. Ricardo, S. D., van Goor, H., & Eddy, A. A. (2008)., »Macrophage diversity in renal injury and repair. *The Journal of clinical investigation*, 118(11), 3522–3530.
44. Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008)., »Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, 8(12), 958–969.
45. Li, L., & Okusa, M. D. (2010)., »Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury. *Seminars in nephrology*, 30(3), 268–277.
46. Nikolic-Paterson, D. J., Wang, S., & Lan, H. Y. (2014)., »Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. *Kidney international supplements*, 4(1), 34–38.
47. Jo, S. K., Sung, S. A., Cho, W. Y., Go, K. J., & Kim, H. K. (2006). , »Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(5), 1231–1239.
48. Giral-Classe, M., Hourmant, M., Cantarovich, D., Dantal, J., Blancho, G., Daguin, P., Ancelet, D., & Soulillou, J. P. (1998). , »Delayed graft function

- of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney international*, 54(3), 972–978.
49. Castro Filho, J. B. S., Pompeo, J. C., Machado, R. B., Gonçalves, L. F. S., Bauer, A. C., & Manfro, R. C. (2022). Delayed Graft Function Under the Microscope: Surveillance Biopsies in Kidney Transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 35, 10344.
 50. Mannon R. B. (2018). , »Delayed Graft Function: The AKI of Kidney Transplantation. *Nephron*, 140(2), 94–98.
 51. Donnelly, C. V., Keller, M., & Kayler, L. (2022). Kidney Transplant Outcomes after Prolonged Delayed Graft Function. *Journal of clinical medicine*, 11(6), 1535.
 52. Phillips, B. L., Ibrahim, M., Greenhall, G. H. B., Mumford, L., Dorling, A., & Callaghan, C. J. (2021). Effect of delayed graft function on longer-term outcomes after kidney transplantation from donation after circulatory death donors in the United Kingdom: A national cohort study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 21(10), 3346–3355.
 53. Ponticelli, C., Reggiani, F., & Moroni, G. (2022). Delayed Graft Function in Kidney Transplant: Risk Factors, Consequences and Prevention Strategies. *Journal of personalized medicine*, 12(10), 1557.
 54. Kernig, K., Albrecht, V., Dräger, D. L., Führer, A., Mitzner, S., Kundt, G., i sur. (2022). Predictors of Delayed Graft Function in Renal Transplantation. *Urologia internationalis*, 106(5), 512–517.
 55. Smeets, B., Boor, P., Dijkman, H., Sharma, S. V., Jirak, P., Mooren, F., i sur. (2013). Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *The Journal of pathology*, 229(5), 645–659.
 56. Yoshida, M., & Honma, S. (2014)., »Regeneration of injured renal tubules. *Journal of pharmacological sciences*, 124(2), 117–122.

57. Humphreys, B. D., Valerius, M. T., Kobayashi, A., Mugford, J. W., Soeung, S., Duffield, J. S. i sur. (2008)., »Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell stem cell*, 2(3), 284–291.
58. Korbély, R., Wilflingseder, J., Perco, P., Kainz, A., Langer, R. M., Mayer, B. i sur. (2011)., »Molecular biomarker candidates of acute kidney injury in zero-hour renal transplant needle biopsies. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 24(2), 143–149.
59. Moein, M., Papa, S., Ortiz, N., & Saidi, R. (2023)., »Protocol Biopsy After Kidney Transplant: Clinical Application and Efficacy to Detect Allograft Rejection. *Cureus*, 15(2), e34505.
60. Sakai, K., Oguchi, H., Muramatsu, M., & Shishido, S. (2018)., »Protocol graft biopsy in kidney transplantation. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, 23 Suppl 2, 38–44.
61. Wilkinson A. (2006)., »Protocol transplant biopsies: are they really needed?. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 1(1), 130–137.
62. Rush D. (2010)., »Protocol biopsies for renal transplantation. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, 21(1), 1–9.«.
63. Kościelska-Kasprzak, K., Bartoszek, D., Myszka, M., Zabińska, M., & Klinger, M. (2014). , »The complement cascade and renal disease. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 62(1), 47–57.
64. Kos M, Galešić Ljubanović D, Zamolo G, (2023) Poremećaji imunog sustava, Patologija, šesto prerađeno i dopunjeno izdanje, Medicinska naklada, Poglavlje 3, str. 81-116.
65. González-Molina, M., Ruiz-Esteban, P., Caballero, A., Burgos, D., Cabello, M., Leon, M., i sur. (2016). , »Immune response and histology of humoral rejection in kidney transplantation. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*, 36(4), 354–367.
66. Becker, J. U., Seron, D., Rabant, M., Roufosse, C., & Naesens, M. (2022)., »Evolution of the Definition of Rejection in Kidney Transplantation and Its

- Use as an Endpoint in Clinical Trials. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 35, 10141.
67. Wu, K., Budde, K., Schmidt, D., Neumayer, H. H., & Rudolph, B. (2014). , »Pathologic characteristics of early or late acute cellular rejection and outcome after kidney transplant. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 12(4), 314–322.«.
 68. Tanase, D. M., Gosav, E. M., Radu, S., Costea, C. F., Ciocoiu, M., Carauleanu, A., i sur. (2019). The Predictive Role of the Biomarker Kidney Molecule-1 (KIM-1) in Acute Kidney Injury (AKI) Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 20(20), 5238.
 69. Zou, C., Wang, C., & Lu, L. (2022)., »Advances in the study of subclinical AKI biomarkers. *Frontiers in physiology*, 13, 960059.
 70. Kashani, K., Cheungpasitporn, W., & Ronco, C. (2017)., »Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 55(8), 1074–1089.
 71. Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016)., »Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148(2), 125–139.
 72. Rabb H. (2002). , »The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney. *Kidney international*, 61(6), 1935–1946.
 73. Tammaro, A., Kers, J., Scantlebery, A. M. L., & Florquin, S. (2020)., »Metabolic Flexibility and Innate Immunity in Renal Ischemia Reperfusion Injury: The Fine Balance Between Adaptive Repair and Tissue Degeneration. *Frontiers in immunology*, 11, 1346.
 74. Jang, H. R., & Rabb, H. (2009)., »The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 130(1), 41–50.
 75. Colvin R. B. (2007)., »Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18(4), 1046–1056.
 76. Matignon, M., Muthukumar, T., Seshan, S. V., Suthanthiran, M., & Hartono, C. (2012)., »Concurrent acute cellular rejection is an independent risk factor

- for renal allograft failure in patients with C4d-positive antibody-mediated rejection. *Transplantation*, 94(6), 603–611.
77. Lai, X., Zheng, X., Mathew, J. M., Gallon, L., Leventhal, J. R., & Zhang, Z. J. (2021)., »Tackling Chronic Kidney Transplant Rejection: Challenges and Promises. *Frontiers in immunology*, 12, 661643.
 78. Rodriguez-Manzanet, R., Sanjuan, M. A., Wu, H. Y., Quintana, F. J., Xiao, S., Anderson, A. C., i sur. (2010)., »T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8706–8711.
 79. Franzese, O., Mascali, A., Capria, A., Castagnola, V., Paganizza, L., & Di Daniele, N. (2013)., »Regulatory T cells in the immunodiagnosis and outcome of kidney allograft rejection. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 852395.
 80. Baldwin, W. M., 3rd, Valujskikh, A., & Fairchild, R. L. (2016). »Mechanisms of antibody-mediated acute and chronic rejection of kidney allografts. *Current opinion in organ transplantation*, 21(1), 7–14.
 81. Rodríguez Castellanos, F. E., Domínguez Quintana, F., Soto Abraham, V., & Mancilla Urrea, E. (2018). »Classification of Acute Rejection Episodes in Kidney Transplantation: a Proposal Based on Factor Analysis. *Iranian journal of kidney diseases*, 12(2), 123–131.«.
 82. Corrêa, R. R., Machado, J. R., da Silva, M. V., Helmo, F. R., Guimarães, C. S., Rocha, L. P., i sur. (2013). »The importance of C4d in biopsies of kidney transplant recipients. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 678180.
 83. Halloran, P. F., Reeve, J. P., Pereira, A. B., Hidalgo, L. G., & Famulski, K. S. (2014)., »Antibody-mediated rejection, T cell-mediated rejection, and the injury-repair response: new insights from the Genome Canada studies of kidney transplant biopsies. *Kidney international*, 85(2), 258–264.
 84. Bailly, V., Zhang, Z., Meier, W., Cate, R., Sanicola, M., & Bonventre, J. V. (2002). , »Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *The Journal of biological chemistry*, 277(42), 39739–39748.

85. Malyszko, J., Koc-Zorawska, E., Malyszko, J. S., & Mysliwiec, M. (2010). , »Kidney injury molecule-1 correlates with kidney function in renal allograft recipients. *Transplantation proceedings*, 42(10), 3957–3959.
86. Yang, L., Brooks, C. R., Xiao, S., Sabbisetti, V., Yeung, M. Y., Hsiao, L. L., i sur. (2015). , »KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *The Journal of clinical investigation*, 125(4), 1620–1636.
87. Zhang, Z., Humphreys, B. D., & Bonventre, J. V. (2007). , »Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18(10), 2704–2714.
88. Humphreys, B. D., Xu, F., Sabbisetti, V., Grgic, I., Movahedi Naini, S., Wang, N., i sur. (2013). , »Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 123(9), 4023–4035.
89. Nogare, A. L., Veronese, F. V., Carpio, V. N., Montenegro, R. M., Pedroso, J. A., Pegas, K. L. i sur. (2015). Kidney injury molecule-1 expression in human kidney transplants with interstitial fibrosis and tubular atrophy. *BMC nephrology*, 16, 19.
90. Johnson, R. K., Sarmarapungavan, D., Parasuraman, R. K., Maine, G., Rooney, M. T., Wolforth, S. C., i sur. (2013). , »Acute tubular injury is an important component in type I acute antibody-mediated rejection. *Transplantation proceedings*, 45(9), 3262–3268.
91. Rogulska, K., Wojciechowska-Koszko, I., Dołęgowska, B., Kwiatkowska, E., Roszkowska, P., Kapczuk, P., i sur. (2022). The Most Promising Biomarkers of Allogeneic Kidney Transplant Rejection. *Journal of immunology research*, 2022, 6572338.
92. Schröppel, B., Krüger, B., Walsh, L., Yeung, M., Harris, S., Garrison, K., i sur. (2010)., »Tubular expression of KIM-1 does not predict delayed function after transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(3), 536–542.
93. Simic Ogrizovic, S., Bojic, S., Basta-Jovanovic, G., Radojevic, S., Pavlovic, J., Kotur Stevuljevic, J., i sur. (2013). , »Tissue kidney injury molecule-1

- expression in the prediction of renal function for several years after kidney biopsy. *Disease markers*, 35(5), 567–572.
94. van Timmeren, M. M., Vaidya, V. S., van Ree, R. M., Oterdoom, L. H., de Vries, A. P., Gans, R. O., i sur. (2007)., »High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of graft loss in renal transplant recipients. *Transplantation*, 84(12), 1625–1630.
 95. Peng, S., Liu, N., Wei, K., Li, G., Zou, Z., Liu, T., i sur. (2022). The Predicted Value of Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) in Healthy People. *International journal of general medicine*, 15, 4495–4503.
 96. Kuehn, E. W., Park, K. M., Somlo, S., & Bonventre, J. V. (2002). , »Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. *American journal of physiology. Renal physiology*, 283(6), F1326–F1336.
 97. Song, L., Xue, L., Yu, J., Zhao, J., Zhang, W., & Fu, Y. (2013). , »Kidney injury molecule-1 expression is closely associated with renal allograft damage. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 13(3), 170–174.
 98. Khandrika, L., Koul, S., Meacham, R. B., & Koul, H. K. (2012). , »Kidney injury molecule-1 is up-regulated in renal epithelial cells in response to oxalate in vitro and in renal tissues in response to hyperoxaluria in vivo. *PloS one*, 7(9), e44174.
 99. Han, W. K., Alinani, A., Wu, C. L., Michaelson, D., Loda, M., McGovern, F. J., Thadhani, R., & Bonventre, J. V. (2005). Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(4), 1126–1134.
 100. Zhang, J., Brown, R. P., Shaw, M., Vaidya, V. S., Zhou, Y., Espandiari, P., Sadrieh, N., Stratmeyer, M., Keenan, J., Kilty, C. G., Bonventre, J. V., & Goering, P. L. (2008). , »Immunolocalization of Kim-1, RPA-1, and RPA-2 in kidney of gentamicin-, mercury-, or chromium-treated rats: relationship to renal distributions of iNOS and nitrotyrosine. *Toxicologic pathology*, 36(3), 397–409.
 101. Lin, Q., Chen, Y., Lv, J., Zhang, H., Tang, J., Gunaratnam, L., i sur. (2014)., »Kidney injury molecule-1 expression in IgA nephropathy and its

- correlation with hypoxia and tubulointerstitial inflammation. *American journal of physiology. Renal physiology*, 306(8), F885–F895.
102. Punsawad, C., & Viriyavejakul, P. (2017)., »Increased expression of kidney injury molecule-1 and matrix metalloproteinase-3 in severe *Plasmodium falciparum* malaria with acute kidney injury. *International journal of clinical and experimental pathology*, 10(7), 7856–7864.«.
 103. Rodrigo, E., López-Hoyos, M., Escallada, R., Fernández-Fresnedo, G., Ruiz, J. C., Piñera, C., i sur. (2000)., »Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-2 in renal transplant recipients with chronic transplant nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 15(12), 2041–2045.
 104. Catania, J. M., Chen, G., & Parrish, A. R. (2007). , »Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *American journal of physiology. Renal physiology*, 292(3), F905–F911.
 105. Si-Tayeb, K., Monvoisin, A., Mazzocco, C., Lepreux, S., Decossas, M., Cubel, G., Taras, D., Blanc, J. F., Robinson, D. R., & Rosenbaum, J. (2006). , »Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *The American journal of pathology*, 169(4), 1390–1401.
 106. Bejarano, P. A., Noelken, M. E., Suzuki, K., Hudson, B. G., & Nagase, H. (1988)., »Degradation of basement membranes by human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *The Biochemical journal*, 256(2), 413–419.
 107. Lenz, O., Elliot, S. J., & Stetler-Stevenson, W. G. (2000). , »Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11(3), 574–581.
 108. Hsu, T. W., Kuo, K. L., Hung, S. C., Huang, P. H., Chen, J. W., & Tarng, D. C. (2013)., »Progression of kidney disease in non-diabetic patients with coronary artery disease: predictive role of circulating matrix metalloproteinase-2, -3, and -9. *PloS one*, 8(7), e70132.

109. Visse, R., & Nagase, H. (2003)., »Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827–839.
110. Jones, T. K., Reilly, J. P., Anderson, B. J., Miano, T. A., Dunn, T. G., Weisman, A. R., Agyekum, R., Feng, R., Ittner, C. A. G., Shashaty, M. G. S., & Meyer, N. J. (2022). , »Elevated Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase-3 and Tissue-Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-1 Associate With Organ Dysfunction and Mortality in Sepsis. *Shock* (Augusta, Ga.), 57(1), 41–47.
111. Murphy, G., & Nagase, H. (2008)., »Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular aspects of medicine*, 29(5), 290–308.
112. Toth, M., Chvyrkova, I., Bernardo, M. M., Hernandez-Barrantes, S., & Fridman, R. (2003)., »Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, 308(2), 386–395.
113. Tan, R. J., & Liu, Y. (2012). , »Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *American journal of physiology. Renal physiology*, 302(11), F1351–F1361.
114. Preston, G. A., Barrett, C. V., Alcorta, D. A., Hogan, S. L., Dinwiddie, L., Jennette, J. C., i sur. (2002). , »Serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-3 levels in dialysis patients vary independently of CRP and IL-6 levels. *Nephron*, 92(4), 817–823.
115. Giannandrea, M., & Parks, W. C. (2014)., »Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease models & mechanisms*, 7(2), 193–203.
116. Basile, D.P., Fredrich, K., Weihrauch, D., Hattan, N., & Chilian, W.M. (2003)., »Angiostatin and matrix metalloprotease expression following ischemic acute renal failure. *American journal of physiology. Renal physiology*, 286(5), F893–F902.
117. Hayashida, K., Bartlett, A. H., Chen, Y., & Park, P. W. (2010). , »Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anatomical record* (Hoboken, N.J. : 2007), 293(6), 925–937.

118. Kunugi, S., Shimizu, A., Kuwahara, N., Du, X., Takahashi, M., Terasaki, Y., i sur. (2011). , »Inhibition of matrix metalloproteinases reduces ischemia-reperfusion acute kidney injury. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 91(2), 170–180.
119. Sanders, J. S., van Goor, H., Hanemaaijer, R., Kallenberg, C. G., & Stegeman, C. A. (2004)., »Renal expression of matrix metalloproteinases in human ANCA-associated glomerulonephritis. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association, 19(6), 1412–1419.
120. Ra, H. J., & Parks, W. C. (2007). , »Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 26(8), 587–596.
121. Okada, Y., Takeuchi, N., Tomita, K., Nakanishi, I., & Nagase, H. (1989). , »Immunolocalization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases, 48(8), 645–653.
122. Singh, G., Singh, L., Ghosh, R., Nath, D., & Dinda, A. K. (2016). , »Immunofluorescence on paraffin embedded renal biopsies: Experience of a tertiary care center with review of literature. World journal of nephrology, 5(5), 461–470.
123. Agarwal, S. K., Sethi, S., & Dinda, A. K. (2013). , »Basics of kidney biopsy: A nephrologist's perspective. Indian journal of nephrology, 23(4), 243–252.
124. https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf
125. <https://www.eurotransplant.org/>

8 ŽIVOTOPIS

Jurica Vuković, rođen je 15. ožujka 1977. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i Nadbiskupsku klasičnu gimnaziju završio je u Zagrebu. Studij medicine upisao je 1995. godine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, diplomirao je 2001. godine. Pripravnički staž odradio je u Kliničkoj Bolnici Dubrava, a stručni ispit položio je 2004. godine. Iste godine zapošljava se kao odjelni liječnik na Dijabetološkom odjelu Sveučilišne klinike za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma Vuk Vrhovac. Od 2005. godine radi u Domu zdravlja MUP-a na terenskim poslovima. Kao specijalizant urologije radio je na Kliničkoj Bolnici Merkur od 2008. do 2013. godine. Specijalistički ispit položio 2014. godine, ispit iz uže specijalizacije andrologije položio 2022. godine. Radi na Odjelu urologije na Kliničkoj bolnici Merkur.

Sudjelovao je na više tečajeva, radionica i simpozija.

Objavljeni radovi u kojima je prvi autor i koautor:

1. Vuković J, Valetić AM, Prkačin I. Kidney Transplant and Pregnancy. BANTAO Journal 2019; 17(1): 1-3
2. Bilinovac L, Kurjaković I, Vuković J, Jug J, Lovrić Benčić M, Prkačin I. Oscillometric Measurement of Pulse Wave Velocity in Hypertensive Crisis. *Cardiol Croat.* 2020;15(1-2):22-6.
3. Vuković J, Delalić D, Prkačin I. Expression of MMP-3 and KIM-1 in the cells of kidneys affected by acute tubular necrosis or acute cellular rejection post-transplant. Poster presentation. October 12-25. 2023, Zagreb, Book of Abstracts. International Congress HDNDT
4. Pervan P, Svaguša T, Prkačin I, Vuković J. Urine concentrations of high-sensitivity cardiac troponin I in healthy adults-preliminary reference intervals. *Acta Med Croatica*, 72 (2018) 461-465
5. Delalić Đ, Vuković J, Prkačin I. The effect of the presence of multiple (accessory) renal arteries on biochemical parameters of renal function and hemodynamic measurements. International Congress HDNTD 2023. October 12-15. 2023, Zagreb, Book of Abstracts.
6. Ćorić-Martinović V, Delalić Đ, Brežni T, Vuković J, Prkačin I. The effect of the presence of multiple (accessory) renal arteries on biochemical parameters

of renal function and hemodynamic measurements. KIReports 2024;9(4): S327.
Doi.org/10.1016/j.ekir.2024.02.632

7. Delalić Đ, Vuković J, Prkačin I. The effect of intraoperative intravenous fluid choice on biochemical markers and postoperative graft function in renal transplantation surgery: a literature review. DiaTranspl 2024, Opatija 17-20.10.24., Book of Abstract.