

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Vladimir Perović

**Ispitivanje značaja polimorfizama gena za citokine i
proteine koji regulišu metabolizam i transport
imunosupresivnih lekova u akutnom odbacivanju
transplantiranog bubrega**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Vladimir Perović

Evaluation of the polymorphisms in genes encoding cytokines and immunosuppressive drug transporters and metabolizing enzymes in acute kidney rejection

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018

Mentor

Prof. dr Vera Pravica
Medicinski fakultet u Beogradu

Članovi Komisije

Prof. dr Višnja Ležaić
Medicinski fakultet u Beogradu
Predsednik Komisije

Komentor

Prof. dr Radomir Naumović
Medicinski fakultet u Beogradu

Prof. dr Miloš Marković
Medicinski fakultet u Beogradu

Prof. dr Danilo Vojvodić
Vojnomedicinska akademija u Beogradu

Zahvalnica

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Veri Pravici, mentoru, na ukazanom poverenju, podršci i korisnim savetima,
Prof. dr Radomiru Naumoviću, komentoru, čije je veliko znanje značajno doprinelo lakšem savladavanju složene problematike transplantacije bubrega koja je predmet ove teze,
Prof. dr Milošu Markoviću na bezrezervnoj podršci prilikom pisanja rada kao i korisnim savetima kojima je značajno unapredio ovu doktorską tezu,
Dr Milici Kravljači na pomoći oko sakupljanja demografskih i kliničkih podataka bolesnika koji su učestvovali u ovoj studiji
Prof. dr Dušanu Popadiću koji svoju ogromnu energiju i ljubav prema nauci deli sa svojim mlađim kolegama i sa kojim je pravo zadovoljstvo saradivati,
Posebnu zahvalnost dugujem **Ass. dr Dijani Perović**, mojoj supruzi, na velikoj ličnoj i profesionalnoj pomoći u završnoj etapi izrade ove disertacije
Osoblju **Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu** na nesebičnoj pomoći u izradi eksperimentalnog dela istraživanja,
Svim bolesnicima koji su učestvovali u istraživanju takode dugujem veliku zahvalnost
I na kraju, želim da izrazim zahvalnost mojoj deci kojoj i posvećujem tezu: **Lazaru, Mariji i Danilu** koji su mi pomogli da istrajem u ovom poduhvatu i koji svojim prisustvom svaki trenutak čine beskrajno lepim.

Ispitivanje značaja polimorfizama gena za citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport immunosupresivnih lekova u akutnom odbacivanju transplantiranog bubrega

Vladimir Perović

Sažetak

Uvod: Transplantacija predstavlja najbolju terapijsku opciju za lečenje terminalne insuficijencije bubrega. Najčešće rane komplikacije nakon transplantacije su akutno odbacivanje (AO) i odložena funkcija kalema (*engl.* delayed graft function, DGF). Mehanizmi koji leže u osnovi ovih događaja su heterogeni i predstavljaju niz kompleksnih interakcija koje se odvijaju između primaoca i organa koji je transplantiran. Uloga imunskog sistema u transplantaciji bubrega je dobro definisana i ona predstavlja glavnu prepreku u postizanju boljeg kratkoročnog/dugoročnog preživljavanja kalema. Moderna immunosupresivna terapija usmerena je uglavnom na inhibiciju aktivacije i proliferacije različitih imunskih ćelija kao i inhibiciju produkcije solubilnih medijatora zapaljenja kao što su citokini. Očuvanje delikatnog balansa između imunokompetentnog stanja bolesnika i imunske supresije radi očuvanja funkcije kalema je od izuzetnog značaja. Nekoliko studija je ukazalo da varijacije u genima za citokine (TNF, IL-6, IFN-gama i IL-10), kao i u genima za proteine koji utiču na terapijsku efikasnost immunosupresivnih lekova (IMPDH1, CYP3A5, OATP1B1), mogu da posluže kao prediktori kliničkog ishoda nakon transplantacije bubrega.

Ciljevi istraživanja: Cilj ove studije je bio da se utvrdi da li postoji uticaj funkcionalnih polimorfizama na nivou jednog nukleotida (SNP) u genima koji kodiraju TNF (*TNFA*), IL-6 (*IL6*), IFN-gama (*IFNG*), IL-10 (*IL10*), p40 subjedinicu IL-12/IL-23 (*IL12B*), IMPDH1 (*IMPDH1*), citohrom P450 (*CYP5A3*) i OATP1B1 (*SLCO1B1*) na AO i DGF kod bolesnika sa transplantiranim bubregom u Srbiji. Dodatni cilj je bio i da se utvrdi da li postoji povezanost između ovih SNP i biohemijskih parametara bubrežne funkcije (vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije).

Pacijenti i metode: U našu studiju uključeno je 152 bolesnika sa transplantiranim bubregom koji su primali kalcineurinske inhibitore, preparate mikofenolične kiseline i kortikosteroide kao deo standardnog protokola za imunsku supresiju. Za određivanje

genotipa u okviru *TNFA*, *IL6*, *IFNG*, *IL10*, *IL12B*, *IMPDH1*, *CYP3A5* i *SLCO1B1* gena korišćeni su komercijalni TaqMan eseji.

Rezultati: Utvrdili smo povezanost između osoba sa AA genotipom unutar polimorfizma *IL12B* (+1188A/C) i manjeg rizika od nastanka DGF ($p=0,028$) uz izračunat odnos šansi (OŠ) od 0,43 u 95% intervalu poverenja (IP) od 0,20 do 0,92. Ovo ukazuje na moguću protektivnu ulogu A alela u patogenezi DGF kod bolesnika sa transplantiranim bubregom. Takva asocijacija nije detektovana u vezi sa AO. U našoj kohorti, nijedan od drugih SNP analiziranih u genima *TNFA* (-308G/A), *IL6* (-174G/C), *IFNG* (+874T/A), *IL10* (-1082G/A, -819T/C, -592C/A), *IMPDH1* (-106G/A) i *SLCO1B1* (+388A/G i +521T/C) nije udružen sa pojavom AO ili DGF. Takođe, nije pronađena ni povezanost između nijednog od analiziranih SNP i vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije. Genska varijanta rs776746 u *CYP3A5* nema karakteristike polimorfizma u našoj populaciji s obzirom da je A alel detektovan samo kod jedne zdrave osobe u kontrolnoj grupi.

Zaključak: U našoj studiji, mi smo preliminarno pokazali da je AA genotip rs3212227 u genu *IL12B* najverovatnije povezan sa nižim rizikom od pojave DGF nakon transplantacije bubrega. Takođe, ustanovili smo da ostali ispitivani SNP u genima za citokine kao i u genima *IMPDH1* i *SLCO1B1* nisu povezani sa AO odnosno DGF. Neophodno je da se u budućnosti sprovedu dodatne dobro dizajnirane studije kako bi se naši rezultati potvrdili.

KLJUČNE REČI: transplantacija bubrega, polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP), citokini, *TNFA* (rs1800629), *IL6* (rs1800795), *IFNG* (rs2430561), *IL10* (rs1800896 i rs1800871), *IL12B* (rs3212227), *CYP3A5* (rs776746), *IMPDH1* (rs2278294) i *SLCO1B1* (rs2306283 i rs4149056), akutno odbacivanje, odložena funkcija kalema

NAUČNA OBLAST: Medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Imunologija

UDK:

Evaluation of the polymorphisms in genes encoding cytokines and immunosuppressive drug transporters and metabolizing enzymes in acute kidney rejection

Vladimir Perović

Abstract

Introduction: Transplantation is the best treatment option for end stage kidney disease. The most common early complications in the post-transplant period are acute rejection (AR) of the graft and delayed graft function (DGF). The underlying mechanisms in these events are heterogeneous and represent complex interactions between the recipient and transplanted organ. The role of immune system in kidney transplantation is well-defined and it poses a major barrier in achieving better short-term/long-term graft survival. A modern immunosuppressive drugs mainly inhibit activation and proliferation of different immune cell populations as well as production of soluble inflammatory mediators such as cytokines. Maintaining the delicate balance between patient immunocompetent state and prevention of graft loss is paramount in kidney transplantation. Several studies indicated that genetic variations in genes encoding cytokines (TNF, IL-6, IFN-gamma and IL-10) and proteins that affect therapeutic efficacy of immunosuppressive drugs (IMPDH1, CYP3A5 and OATP1B1) may serve as potential predictors of clinical outcome in kidney transplantation.

Aims of the investigation: This study aimed to determine the influence of functional single nucleotide polymorphisms (SNP) in the genes encoding TNF (*TNFA*), IL-6 (*IL6*), IFN-gamma (*IFNG*), IL-10 (*IL10*), p40 subunit of IL-12/IL-23 (*IL12B*), CYP3A5 (*CYP3A5*), IMPDH1 (*IMPDH1*) and OATP1B1 (*SLCO1B1*) on AR and DGF in Serbian kidney allograft recipients. In addition, we wanted to investigate relationship between these SNPs and biochemical parameters of renal function (serum creatinine, creatinine clearance and proteinuria).

Patients and methods: Our study involved 152 kidney transplant recipients on standard immunosuppressive regimen which included calcineurin inhibitors,

mycophenolic acid derivatives and corticosteroids. Genotyping of *TNFA*, *IFNG*, *IL6*, *IL10*, *IL12B*, *CYP3A5*, *IMPDH1* and *SLCO1B1* was performed using commercial TaqMan assays.

Results: We found association between the carriers of AA genotype of *IL12B* +1188A/C polymorphism (rs3212227) and a lower rate of DGF ($p=0.028$, $OR=0.43$, $95\%CI=0.20-0.92$), implying protective role of A allele in the pathogenesis of DGF in kidney transplant recipients, whereas no such association was observed with AR. None of the analyzed SNPs in *TNFA* (-308G/A), *IL6* (-174G/C), *IFNG* (+874T/A), *IL10* (-1082G/A, -819T/C, -592C/A), *IMPDH1* (-106G/A) and *SLCO1B1* (+388A/G and 521T/C) were associated with AR or DGF in our patients. In addition, we found no association between analyzed SNPs and levels of serum creatinine, creatinine clearance or proteinuria. *CYP3A5* genetic variant rs776746 was not polymorphic in our study group because only one A allele carrier was detected in healthy control group.

Conclusions: In our study we demonstrated preliminary evidence that the AA genotype of rs3212227 SNP in the *IL12B* gene might be associated with a lower risk for DGF after kidney transplantation. We have also shown that SNPs in other investigated cytokine genes as well as in *IMPDH1* and *SLCO1B1* were not associated with AR or DGF. In the future, additional well-designed large studies are required for the validation of our results.

KEY WORDS: kidney transplantation, cytokine gene polymorphisms, *TNFA* (rs1800629), *IL6* (rs1800795), *IFNG* (rs2430561), *IL10* (rs1800896 and rs1800871), *IL12B* (rs3212227), *CYP3A5* (rs776746), *IMPDH1* (rs2278294) and *SLCO1B1* (rs2306283 and rs4149056), acute rejection, delayed graft function

SCIENTIFIC FIELD: Medicine

SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD: Immunology

UDK:

Sadržaj

1. UVOD	1
1.2. KOMPLIKACIJE NAKON TRANSPLANTACIJE BUBREGA	3
1.2.1. ODLOŽENA FUNKCIJA KALEMA	3
1.2.2. ODBACIVANJE KALEMA	4
1.3. FAKTORI KOJI UTIČU NA ISHOD TRANSPLANTACIJE BUBREGA	5
1.3.1. DAVALAC ODNOSNO „KVALITET“ BUBREGA KOJI SE PRESAĐUJE	5
1.3.2. UZRASST BOLESNIKA	5
1.3.3. PRIMARNO OBOLJENJE BUBREGA	6
1.3.4. PODUDARNOST U OKVIRU HLA LOKUSA	6
1.3.5. ANTI-HLA ANTITELA	7
1.3.6. RASNA I ETNIČKA PRIPADNOST	8
1.4. ULOGA IMUNSKOG ODGOVORA U TRANSPLANTACIJI BUBREGA	8
1.4.1. ULOGA STEČENE IMUNOSTI U TRANSPLANTACIJI BUBREGA	8
1.4.2. ULOGA UROĐENE IMUNOSTI U TRANSPLANTACIJI BUBREGA	10
1.4.3. ULOGA CITOKINA U TRANSPLANTACIJI BUBREGA	12
1.4.1. POLIMORFIZMI GENA ZA CITOKINE	16
1.4.1.1. Polimorfizam rs1800629 u genu TNFA	16
1.4.1.2. Polimorfizam rs1800795 u genu IL6	17
1.4.1.3. Polimorfizam rs2430561 u genu IFNG	17
1.4.1.4. Polimorfizmi rs1800896, rs1800871 i rs1800872 u genu IL10	18
1.4.1.5. Polimorfizam rs3212227 u genu IL12B	18
1.5. IMUNOSUPRESIVNA TERAPIJA U TRANSPLANTACIJI BUBREGA	19
1.5.1. PROTEINI KOJI UTIČU NA TERAPIJSKU EFIKASNOST IMUNOSUPRESIVNIH LEKOVA	21
1.5.2. POLIMORFIZMI U GENIMA CYP3A5, IMPDH1 I SLC01B1	23
1.5.2.1. Polimorfizam rs776746 u genu CYP3A5	23
1.5.2.2. Polimorfizam rs2278294 u genu IMPDH1	23
1.5.2.3. Polimorfizmi rs2306283 i rs4149056 u SLC01B1 genu	24
2. CILJEVI	26
3. MATERIJAL I METODE	28
3.1. DIZAJN STUDIJE	29
3.2. ISPITANICI	29
3.2.1. KRITERIJUMI ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE AKUTNOG ODBACIVANJA I ODLOŽENE FUNKCIJE KALEMA	29

3.3. METODE	30
3.3.1. UZIMANJE KRVI.....	30
3.3.2. IZOLACIJA DNK	30
3.3.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I ČISTOĆE IZOLOVANE DNK.....	31
3.3.2. DETEKCIJA I ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA REAKCIJOM LANČANOG UMNOŽAVANJA (PCR) U REALNOM VREMENU (<i>ENGL.</i> REAL-TIME PCR)	31
3.4. STATISTIČKA ANALIZA	33
<u>4. REZULTATI</u>	34
4.1. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM	35
4.2. MOLEKULARNO GENETIČKA ANALIZA	36
4.2.1. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA <i>TNFA</i> GENA (RS1800629) KOD BOLESNIKA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	37
4.2.2. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA <i>IL6</i> GENA (RS1800795) KOD BOLESNIKA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	40
4.2.3. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA <i>IFNG</i> GENA (RS2430561) KOD PACIJENATA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	42
4.2.4. ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA <i>IL10</i> GENA (RS1800896, RS1800871 I RS1800872) KOD BOLESNIKA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	44
4.2.5. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA <i>IL12B</i> GENA (RS 3212227) KOD BOLESNIKA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	50
4.2.6. ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA PROTEINE KOJI UTIČU NA TERAPIJSKU EFIKASNOST IMUNOSUPRESIVNIH LEKOVA	52
4.2.7. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA <i>IMPDH1</i> GENA (RS2278294) KOD BOLESNIKA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	53
4.2.8. ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA <i>SLCO1B1</i> GENA (RS2306283 I RS4149056) KOD BOLESNIKA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	55
4.2.1. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA <i>CYP3A5</i> GENA (RS776746) KOD BOLESNIKA SA TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM.....	60
4.3. ISPITIVANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA ZA CITOKINE I VREDNOSTI SERUMSKOG KREATININA, KLIRENSA KREATININA I PROTEINURIJE KOD BOLESNIKA NAKON TRANSPLATACIJE BUBREGA	60
4.4. ISPITIVANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZAMA GENA ZA PROTEINE KOJI METABOLIŠU I TRANSPORTUJU LEKOVE I VREDNOSTI SERUMSKOG KREATININA, KLIRENSA KREATININA I PROTEINURIJE KOD BOLESNIKA NAKON TRANSPLATACIJE BUBREGA	63

5. DISKUSIJA	65
6. ZAKLJUČCI	83
7. LITERATURA.....	86

1. Uvod

1.1. Opšti i istorijski aspekti transplantacije bubrega

Transplantacija bubrega predstavlja krajnji i trenutno najbolji oblik lečenja terminalne insuficijencije bubrega. Prestanak funkcionisanja oba bubrega dovodi do brojnih poremećaja u homeostazi telesnih tečnosti. U bubregu se vrši filtracija vode uz oslobađanje viška soli i toksičnih produkata metabolizma ćelija doprinoseći time regulaciji acido-bazne ravnoteže. Retencija vode i soli pomoću renina, enzima koji stvara bubreg, ima važnu ulogu u regulisanju krvnog pritiska. U bubregu se stvaraju i dva hormona, eritropoetin i kalcitriol, koji regulišu eritropoezu odnosno metabolizam kalcijuma. Uzimajući u obzir sve navedeno, dugotrajan poremećaj funkcije bubrega može vitalno ugroziti bolesnika.

Etiologija terminalne insuficijencije bubrega uključuje brojne faktore koje mogu dovesti do trajnog prestanka funkcije ovog organa. Akutna stanja kao što su trauma, infekcija ili toksično oštećenja bubrega nastala uzimanjem lekova mogu biti uzrok ireverzibilnih oštećenja parenhima i tubularnog sistema. U hronična stanja koja mogu izazvati terminalno oštećenje bubrega spadaju primarne bolesti bubrega kao i sistemske autoimunske bolesti drugih organa koje sekundarno mogu oštetiti bubreg. Bolesti koje najčešće dovode do terminalnog oštećenja ovog organa su dijabetes tip 1 i 2, glomerulonefropatije i policistična bolest bubrega. Dijaliza i transplantacija predstavljaju dva osnovna tipa lečenja terminalne insuficijencije bubrega. Nekoliko studija pokazalo je da je transplantacija predstavlja bolji, jeftiniji i dugoročniji vid lečenja od dijalize (1,2).

Prvi pokušaji da se presadi bubreg od preminulog ili živog davaoca nisu dali dugoročne rezultate, pri čemu je usled imunskog odgovora na presađeni bubreg (kalem) dolazilo do prestanka funkcije i njegovog odbacivanja (3,4). Prva uspešna transplantacija obavljena je sredinom pedesetih godina 20. veka u Velikoj Britaniji između identičnih blizanaca kako bi se izbegao imunski odgovor na kalem (5). Ipak, šezdesetih godina 20. veka, najveći napredak napravljen je uvođenjem lekova za imunsku supresiju koji su značajno doprineli preživljavanju kako transplantiranog organa tako i samog bolesnika. Prva transplantacija bubrega u Srbiji urađena je 1973. u Beogradu. Ako se uzme u obzir činjenica da trenutno na ovaj organ u Srbiji čeka oko 800 bolesnika sa terminalnom insuficijencijom bubrega a da se godišnje izvrši oko 50-70 transplantacija, jasno je da ova dinamika ne zadovoljava ni približno potrebe za ovom vrstom intervencije.

1.2. Komplikacije nakon transplantacije bubrega

Nakon transplantacije bubrega mogu nastati brojne komplikacije koje uključuju odbacivanje kalema, odloženu funkciju kalema, infekciju citomegalovirusom, vaskularne komplikacije, nefropatiju uzrokovanu BK virusom, infekcije različitim mikroorganizmima, nastanak posttransplantacionih limfoproliferativnih bolesti i karcinoma, blagih gastrointestinalnih komplikacija, kao i kozmetičkih problema. Iako postoje brojne komplikacije, fokus ove doktorske disertacije biće prvenstveno na akutnom odbacivanju i odloženoj funkciji kalema koje predstavljaju najčešće komplikacije.

1.2.1. Odložena funkcija kalema

Odložena funkcija kalema (DGF, *engl.* delayed graft function) nije jasno definisan entitet i njegova definicija se razlikuje od centra do centra u kome se izvodi transplantacija. Zbog kompleksnosti patofiziološkog mehanizma, definisanje DGF je veoma teško i u prilog ovoj činjenici ide podatak da postoji preko 18 definicija u literaturi kojima se objašnjava ovaj fenomen (6). U našoj studiji DGF je definisana kao potreba za dijalizom unutar prve dve nedelje nakon obavljene transplantacije bubrega. Incidencija DGF zavisi od mnogih intrizičkih faktora davaoca i primaoca kalema kao i faktora vezanih za intraoperativne i postoperativne procedure prilikom izvođenja transplantacije bubrega (7). Incidencija DGF veoma varira, od 10% kada se koriste organi od živog davaoca, pa do 50% kada je u pitanju kadaverična transplantacija (8). Pojava DGF nakon transplantacije iziskuje potrebu za hemodijalizom što značajno povećava morbiditet odnosno dužinu boravka u bolnici, te samim tim i troškove lečenja. Uticaj DGF na dugoročno preživljavanje kalema je i dalje predmet debate. Opšte stanovište je da je DGF povezan sa lošijim dugoročnim preživljavanjem kalema, produženim vremenom hladne ishemije (vreme koje protekne od momenta kada se rashlađenom organu koji se transplantira prekine dotok krvi do momenta kada se on ponovo zagreje i uspostavi perfuzija) kao i posledičnim reperfuzijskim oštećenjem bubrega (9). Međutim, postoje i podaci koji govore da hladna ishemija ostavlja minimalne posledice na presađeni bubreg. Tako su Kayler i autori u dve studije pratili uticaj hladne ishemije na pojavu DGF i dugoročnog preživljavanja kalema, pri čemu su oba bubrega od istog davaoca presađena različitim primaocima (10,11). Utvrđeno je da produženo vreme hladne ishemije utiče na incidenciju DGF ali da nema nikavog uticaja

na preživljavanje presađenog bubrega. Ovim je samo dodatno potvrđena kompleksnost patofiziologije DGF. Veliki broj studija početkom devedesetih godina 20. veka ukazale su i na povezanost DGF sa većom incidencijom akutnog odbacivanja što je i potvrđeno skorašnjom studijom kojom je obuhvaćeno 645 bolesnika koji su lečeni savremenijim terapijskim protokolima (12). Stoga, u cilju prevencije, ili bar smanjenja incidencije DGF, moderni transplantacioni centri primenjuju mere kojima se redukuje vreme hladne ishemije primenom mašina za perfuziju.

1.2.2. Odbacivanje kalema

Odbacivanje transplantiranog bubrega je posledica imunskog odgovora primaoca na presađeni bubreg. Prema vremenu javljanja može biti hiperakutno, akutno i hronično. U savremenoj transplantaciji najčešće se javljaju akutno i hronično odbacivanje. Akutno odbacivanje može biti posredovano antitelima ili T-limfocitima. Akutno odbacivanje (AO) se klinički može manifestovati groznicom, osećajem jeze, noćnim znojenjem, mijalgijom, oligurijom i hipertenzijom. Bolesnici često osećaju bol i palpatorni osećaj tvrdoće na mestu gde je presađen organ. U okviru rutinske laboratorijske dijagnostike mogu se registrovati povećan nivo serumskog kreatinina ili snižena glomerulska filtracija. Ultrazvučni nalaz može pokazati otok bubrega, smanjen ili odložen protok kroz bubreg. Konačna potvrda AO vrši se pomoću biopsije finom iglom i histopatološkim nalazom. U terapiji se primenjuju kortikosteroidi ili, kod AO rezistentnog na terapiju kortikosteroidima, antitimocitni imunoglobulin. Step en oštećenja kalema zavisi od trajanja epizode AO kao i odgovora na terapiju. Neka od oštećenja mogu biti reverzibilna dok trajno nastala oštećenja mogu dovesti do pogoršanja funkcije presađenog organa. Akutno odbacivanje se najčešće dešava u prva 3 meseca a ukoliko se javi nakon tog perioda može se povezati sa neredovnim uzimanjem imunosupresivne terapije odnosno smanjenom komplijansom. U poslednjih dvadeset godina, u svetu postoji jasan trend smanjenja incidencije AO, i smatra se da u najboljim centrima za transplantaciju bubrega ona iznosi između 10 i 15%. Uprkos modernoj terapiji i niskoj incidenciji AO, dugoročno preživljavanje kalema i dalje predstavlja veliki klinički izazov. Smatra se da mnogi drugi faktori poput toksičnosti kalcineurinskih inhibitora, hronično odbacivanje, kao i nefropatija izazvana BK virusom, imaju značajnu ulogu u dugoročnom preživljavanju kalema (13,14).

1.3. Faktori koji utiču na ishod transplantacije bubrega

Uspeh transplantacije zavisi od velikog broja faktora koji uključuje podudaranje između primaoca i davaoca u okviru glavnog kompleksa gena tkivne podudarnosti (MHC, *engl.* main histocompatibility complex; kod čoveka se zove humani leukocitni antigeni, *engl.* human leucocyte antigen, HLA), postojanje antitela protiv antigena kalema kod primaoca, zatim uzrast i etnička pripadnost, kao i specifičnosti vezane za hirušku proceduru. U poslednjih dvadeset godina došlo je do poboljšanja u rezultatima kratkoročnog preživljavanja presađenog bubrega, ali, kada je u pitanju održanje funkcije organa na duži vremenski period, tada su rezultati minimalni ili gotovo i da nema nekog napretka (15). Definicija dugoročnog preživljavanja kalema/bolesnika nije jasno precizirana, ali se arbitrarno može uzeti period od 5 i više godina od momenta transplantacije. Podaci pokazuju da je petogodišnje odnosno desetogodišnje preživljavanju kalema 77% u Evropi odnosno 56% Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (16). Lista potencijalnih faktora koji mogu da utiču na ishod transplantacije je duga, i samo neki od njih će biti pomenuti.

1.3.1. Davalac odnosno „kvalitet“ bubrega koji se presađuje

Karakteristike organa koji se presađuje svakako spada u faktore koji mogu imati veoma značajnu ulogu u dugoročnom preživljavanju kalema. „Kvalitet organa“ se može široko definisati na osnovu karakteristika kao što su: poreklo tj. da li je bubreg poreklom od živog odnosno preminulog davaoca, kao i kliničko-patoloških ocena koje su dobijene na osnovu biopsije bubrega davaoca pre presađivanja. Podaci iz literature nedvosmisleno ukazuju da je organ dobijen od živog davaoca bolji od organa koji je dobijen od preminule osobe (17). Postoje prilično jasni razlozi za ovo jer prilikom korišćenja organa od živog davaoca postoji detaljnja procena funkcije bubrega potencijalnog davaoca, zatim, ne postoji faza agonije koja je prisutna kod umiruće osobe, vreme hladne ishemije je kratko, i preostaje više vremena da bi se sastavio najbolji mogući transplantacioni tim.

1.3.2. Uzrast bolesnika

Uzrast bolesnika je još jedan važan činilac u transplantaciji bubrega. U današnje vreme, bolesnici sa terminalnom insuficijencijom bubrega se transplantiraju u poznijim godinama. U studijama sprovedenim u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD)

pokazano je da uzrast bolesnika u vreme kada je izvršena transplantacija inverzno koreliše sa dugoročnim preživljavanjem kalema (16). Interesantno je pomenuti da su skorašnje studije pokazale da se postižu bolji rezultati u preživljavanju transplantiranog bubrega ukoliko su davalac i primalac sličnog uzrasta tj. „starijem“ primaocu se dodeljuje (*engl.* allocate) bubreg od starijeg davaoca (> 65 godina) odnosno „mlađem“ primaocu se dodeljuje bubreg „mlađeg“ davaoca (18,19).

1.3.3. Primarno oboljenje bubrega

Primarna bolest bubrega koja je uzrokovala terminalnu insuficijenciju bubrega u određenom broju slučajeva može da se ponovo javi, ali sada na presađenom bubregu (recidiv bolesti). Ovo je treći uzročnik gubitka kalema unutar perioda od 10 godina nakon transplantacije (20). Ponovno javljanje osnovne bolesti na transplantiranom organu je uglavnom primećeno kod metaboličkih bolesti i glomerulonefritisa. U nekim slučajevima autoimunskih bolesti gde se javljaju cirkulišuća autoantitela na glomerulsku bazalnu membranu postoji veoma visok rizik od odbacivanja kalema. Slično, antifosfolipidna antitela značajno povećavaju rizik od tromboze krvnih sudova i progresivno dovode do gubitka funkcije presađenog bubrega. Često se transplantacija odlaže dok se aktivnost osnovne bolesti ne dovede pod kontrolu, odnosno, dok koncentracija autoantitela ne bude ispod nivoa detekcije. Na primer, kod IgA nefropatije verovatnoća pojava recidiva bolesti je između 20% i 60% dok je kod membranskog glomerulskog nefritisa između 7% i 44% (20,21). Nažalost, za mnoge druge primarne bolesti bubrega ne postoje podaci o verovatnoći pojave recidiva.

1.3.4. Podudarnost u okviru HLA lokusa

U savremenoj transplantaciji bubrega najčešće se koristi organ poreklom od jedinki iste vrste (alokalem) i u retkim slučajevima organi mogu biti transplantirani između monozigotnih blizanaca (singeni kalem). Strategija za odabir optimalnog davaoca nije se mnogo menjala tokom proteklih decenija. Jedan od osnovnih koraka predstavlja HLA tipizacija, odnosno ispitivanje kompleksa gena tkivne podudarnosti kod čoveka. HLA lokus sadrži više od 200 gena koji se nalaze na kratkom kraku hromozoma 6 i podeljen je u 3 klase i to na HLA klasu I, II i III. Neki od gena koji se nalaze u okviru klase I (*HLA-A, -B, -C*) odnosno klase II (*HLA-DP, -DQ, -DR*) kodiraju proteine eksprimirane na površini ćelija čija je osnovna uloga prezentacija peptida T-limfocitima.

Uticaj nepodudarnosti u okviru *HLA* lokusa na konačni ishod kalema je nedvosmislen. Brojne studije su pokazale da kada postoji idealna podudarnost između davaoca i primaoca, rizik od odbacivanja transplantiranog bubrega je veoma mali (22,23). U velikoj Američkoj studiji pokazano je da bolesnici koji su primili bubreg od davaoca sa kojim postoji nepodudaranje u više od 3 *HLA* lokusa, rizik da se odbaci organ u prvih godinu dana od transplantacije se povećava za 50% u odnosu na bolesnike kod kojih postoji idealno podudaranje (24). Neki autori smatraju da na gubitak kalema najviše utiče nepodudaranje u okviru lokusa *HLA-B* i *HLA-DR* (25,26), dok drugi smatraju da je uloga određenih *HLA* lokusa uslovljena vremenom proteklim nakon transplantacije. Naime, pokazano je da nepodudarnost u okviru *HLA-DR* lokusa ima važnu ulogu u prvih 6 meseci nakon transplantacije, *HLA-B* lokusa u toku prve dve godine, dok *HLA-A* lokus utiče na dugoročno preživljavanje presađenog bubrega (27,28). Navedeni kriterijumi se primenjuju i u programu transplantacije bubrega na teritoriji Republike Srbije pri čemu podudarnost bar u jednom od *HLA-DR* lokusa predstavlja minimalan uslov kako bi se pristupilo presađivanju bubrega.

1.3.5. Anti-*HLA* antitela

Poseban problem u transplantaciji bubrega predstavlja pojava anti-*HLA* antitela u cirkulaciji primaoca. Ova antitela se mogu javiti kod primaoca kao posledica prethodnog izlaganja stranim antigenima putem transfuzije, porođaja ili čak nakon prethodne transplantacije. Bolesnici koji su prethodno bili imunizovani *HLA* antigenima imaju mnogo lošije rezultate kada je u pitanju preživljavanje kalema od onih koji nisu imunizovani. Ovo je dalje potvrđeno i činjenicom da svaki naredni pokušaj transplantacije je značajno lošiji u odnosu na prvu transplantaciju. Praćenje (monitoring) i utvrđivanje prisustva aloreaktivnih antitela kod primaoca je deo standardne pripreme pred transplantaciju i izvodi se pomoću enzimskog imunotesta, hemilumiscentnim tehnikama (Luminex® tehnologija) ili protočnom citofluorimetrijom. Kod bolesnika koji imaju visoke koncentracije anti-*HLA* antitela primenjuje se desenzibilizacija po protokolu koji obuhvata upotrebu visokih doza kortikosteroida, anti-CD20 antitela kao i plazmaferezu.

1.3.6. Rasna i etnička pripadnost

Rasna i etnička pripadnost se već dugo razmatra kao faktor koji utiče na ishod transplantacije. Skorašnja studija sprovedena u SAD pokazala je da kod Afro-Amerikanaca postoji mnogo lošije preživljavanje transplantiranog bubrega u svim ispitivanim vremenskim tačkama (3 meseca, 1, 5 i 10 godina) u odnosu da druge rasne odnosno etničke grupe (29). Interesantno je pomenuti da za populaciju crnaca koja živi u Francuskoj nisu uočene pomenute razlike, što se možda može objasniti različitim nivoom zdravstvene zaštite za različite socijalne kategorije u ove dve države (30).

1.4. Uloga imunskog odgovora u transplantaciji bubrega

Glavna funkcija imunskog sistema je odbrana od infekcije. U osnovi ove funkcije leži sposobnost imunskog sistema da razlikuje sopstvene od stranih antigena. Transplantacijom organa od nesrodne jedinke iste vrste (alotransplantacija) imunski sistem primaoca se izlaže stranim antigenima nakon čega se pokreće snažan imunski odgovor na antigene kalema (aloantigene). Imunski odgovor se sastoji iz niza složenih interakcija između urođene i stečene (adaptivne) imunosti i može se podeliti u tri faze: prepoznavanje aloantigena, aktivacija ćelija imunskog sistema i efektorska faza koja dovodi do odbacivanja presađenog organa.

1.4.1. Uloga stečene imunosti u transplantaciji bubrega

Centralni događaj u inicijaciji imunskog odgovora na kalem predstavlja prepoznavanje kompleksa HLA/peptid od strane T-ćelijskog receptora. HLA lokus kodira veoma raznoliku grupu površinskih proteina koji se nalaze eksprimirani na površini svih ćelija sa jedrom. Interesantno je pomenuti da su ovi proteini prvi put otkriveni četrdesetih godina prošlog veka baš u eksperimentima u kojima su vršene transplantacije tkiva i tada su HLA molekuli identifikovani kao glavni „krivci“ za odbacivanje presađenog organa. Tek dvadeset godina kasnije, ustanovljeno je da prezentacija stranih antigena T-limfocitima predstavlja primarnu funkciju HLA molekula. Ćelije adaptivne imunosti razlikuju strane proteinske antigene od sopstvenih antigena posredstvom procesa prezentacije različitih peptida. Prepoznavanje aloantigena od strane imunskog sistema primaoca kao stranih antigena naziva se aloprepoznavanje. Glavni i najjači odgovor na aloantigene posredovan je T-ćelijama

primaoca (aloreaktivni T-limfociti). Prepoznavanje aloantigena u sklopu HLA može biti direktno i indirektno. Kod direktnog prepoznavanja, T-limfociti primaoca prepoznaju neobrađene alogene HLA molekule na površini dendritskih ćelija kalema kao strane. Nasuprot tome, kod indirektnog prepoznavanja, neophodno je da dendritske ćelije primaoca prethodno fagocituju antigene poreklom iz kalema, obrade ih i prezentuju u sklopu sopstvenih HLA molekula. Direktno prepoznavanje je posebno značajno u inicijaciji akutnog odbacivanja što je i potkrepljeno rezultatima dobijenim u studijama na miševima gde utvrđeno da se više od 90% T-limfocita primaoca koji su direktno prepoznali alogene HLA molekule infiltrira u presađenu kožu (31). S druge strane, smatra se da indirektno prepoznavanje ima veću ulogu u hroničnom odbacivanju. U prilog ovoj tvrdnji ide nalaz većeg broja T-ćelija primaoca unutar kalema koje su sposobne da prepoznaju obrađene peptide poreklom iz davaoca isključivo na sopstvenim dendritskim ćelijama (32,33).

Nakon prepoznavanja aloantigena, T-limfociti se aktiviraju, proliferišu i diferenciraju u efektorske ćelije. Efektorski citotoksični CD8⁺T-limfociti migriraju u kalem gde oštećuju tkivo dok se pomoćnički CD4⁺T-limfociti mogu diferencirati u nekoliko različitih subpopulacija kao što su Th1, Th2, Th17 i regulatorne T-ćelije (Treg). Th1 ćelije proizvode proinflamatorne citokine kao što su interleukin (IL)-2, faktor nekroze tumora (TNF), i interferon (INF)-gama. Ova grupa citokina je značajna za stimulaciju citotoksičnih CD8⁺T-limfocita koji u kalem indukuju apoptozu ćelija oslobađanjem perforina i granzima ili putem Fas/FasL interakcije. Th2 ćelije stvaraju citokine kao što su IL-4, IL-5 i IL-13 koji stimulišu humoralni imunski odgovor i B-limfocite da stvaraju antitela koja su usmerena prema antigenima kalema (aloantitela) (34). U poslednjih nekoliko godina, postoji veliko interesovanje da se bolje razjasni uloga Treg ćelija u imunskom odgovoru na kalem. Neki preliminarni dokazi ukazuju da Treg mogu da indukuju imunsku toleranciju na antigene kalema, ali ovakvi nalazi nisu još potvrđeni kod ljudi (35,36). Uloga Th17 ćelija u imunskom odgovoru na kalem nije do kraja razjašnjena mada neki autori smatraju da ove ćelije stvaranjem proinflamatornih citokina pospešuju oštećenje presađenog organa (37).

Pored T-limfocita, B-limfociti takođe imaju veoma važnu ulogu u imunskom odgovoru na alokalem. Uloga ovih ćelija je dvojaka. Prvo, B-limfociti nakon aktivacije aloantigenima postaju veoma efikasne antigen-prezentujuće ćelije koje imaju izuzetno važnu ulogu u aktivaciji i diferencijaciji T-limfocita (38). S druge strane, B-limfociti

sekretuju aloantitela koja se vezuju za antigene kalema i time aktiviraju sistem komplementa koji će posledično oštetiti tkivo. Pored navedenog mehanizma oštećenja, aloantitela mogu aktivirati i NK ćelije (ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela) ili pak dovesti do aktivacije makrofaga i frustrirane fagocitoze. Ovim je jasno definisana uloga B-limfocita u razvoju akutnog i hroničnog odbacivanja kalema (39).

1.4.2. Uloga urođene imunosti u transplantaciji bubrega

Pored adaptivne imunosti, urođena imunost ima takođe važnu ulogu u oštećenju kalema. Njena uloga je decenijama bila prenebregnuta i stavljena u drugi plan (40). Dendritske ćelije spadaju u ćelije urođene imunosti i predstavljaju najpotentnije antigen-prezentujuće ćelije. U mešanoj kulturi limfocita, one imaju sposobnost da gotovo 100 puta jače aktiviraju T-limfocite u odnosu na makrofage. Dendritske ćelije se nalaze u limfoidnim i nelimfoidnim tkivima organizma uključujući i bubreg (41). Od momenta kada preuzmu antigen pa do trenutka kada prezentuju antigen T-limfocitima, dendritske ćelije se diferenciraju i dobijaju nove fenotipske karakteristike. Za ovakvu tranziciju od nezrele do zrele dendritske ćelije neophodna je odgovarajuća mikrosredina koja je karakteristična za zapaljenje. U stanju „mirovanja“ dendritske ćelije sekretuju citokine koji prevashodno stimulišu diferencijaciju pomoćničkih T-limfocita u Treg dok prilikom zapaljenja dendritske ćelije se aktiviraju, njihov broj se uvećava i sekretuju citokine koji doprinose nastanku efektorskih T-limfocita (42). Dendritske ćelije imaju ključnu ulogu u inicijaciji i regulaciji stečenog imunskog odgovora. Nakon transplantacije bubrega, aktivirane dendritske ćelije primaoca i davaoca aktivno učestvuju u odbacivanju alokalema tako što aktiviraju T-limfocite primaoca putem indirektnog i direktnog aloprepoznavanja. Postoji veliki broj studija koje su pokazale da zrele i poluzrele dendritske ćelije mogu da indukuju toleranciju na sopstvene antigene u centralnim i perifernim tkivima putem delecije i anergije (43). Ova istraživanja su dalje podstakla ideju da se ova osobina dendritskih ćelija potencijalno iskoristi kako bi se indukovala tolerancija na transplantiran organ. Brojnim biološkim, farmakološkim i genetičkim modifikacijama dendritskih ćelija *ex vivo* postignuti su zavidni rezultati na eksperimentalnim životinjama (44,45) mada njihova klinička primena još nije moguća i zahteva istraživanja na boljim modelima kao što su primati.

Land i sar. su postavili „Hipotezu povrede“ u kojoj se pretpostavlja da ćelije urođene imunosti reaguju na molekule koji se oslobađaju iz oštećenih ćelija kalema u

toku ishemijsko-reperfuzijske povrede (46). Ovi molekuli se nazivaju molekulski obrasci oštećenja (*engl.* damage-associated molecular patterns, DAMP). Usled ishemije stvara se veoma mala količina adenozin-trifosfata (ATP) i snižava se pH unutar ćelija. Ovim se narušava aktivnost K^+/Na^+ ATP pumpe što posledično dovodi do poremećaja osmotske ravnoteže. Ćelije kalema bubre i počinju da ekspimiraju adhezivne molekule kao što su E-, P-selektini i intercelularni adhezivni molekul-1 (*engl.* intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) koji pospešuju ulazak leukocita u kalem tokom faze reperfuzije. U toku ove faze iz oštećenih ćelija se oslobađa velika količina DAMP kao i reaktivni oblici kiseonika (ROK) koji su nastali usled oštećenja mitohondrija. ROK stvaraju i neutrofili koji postepeno infiltriraju kalem i posredstvom hemokina dodatno privlače aloreaktivne T-ćelije (47). Na ovaj način se pojačava zapaljenje i dodatno oštećuje kalem.

Neophodno je spomenuti još i makrofage koji spadaju u ćelije urođene imunosti a imaju veoma važnu ulogu imunskom odgovoru na alokalem (48). Makrofagi infiltriraju kalem u velikom broju (38-60% od svih leukocita) što su i pokazale studije gde je analiziran materijal dobijen biopsijom transplantiranog tkiva (49,50). U literaturi su do sada opisane dve populacije makrofaga: klasično aktivirani (M1) i alternativno aktivirani (M2). M1 makrofagi spadaju u ćelije koje pospešuju zapaljenski proces i sekretuju brojne citokine kao što su IL-1, IL-6, TNF i IL-23 (51). Ovi citokini u alokalemu aktiviraju citotoksične $CD8^+$ T-limfocite, endotelne ćelije u krvnim sudovima i stimulišu stvaranje faktora stimulacije kolonija (*engl.* colony stimulating factor-1, CSF-1). M1 makrofagi predstavljaju i primarni izvor ROK kao i reaktivnih oblika azota (ROA) koji direktno oštećuju tkivo i indukuju akutno odbacivanje (52,53). Za razliku od akutnog odbacivanja, kod hroničnog odbacivanja postoje dokazi da i jedna i druga populacija makrofaga ima veoma važnu ulogu. Hronično odbacivanje transplantiranog bubrega praćeno je intersticijalnom fibrozom tkiva, formiranjem neointime i progresivnim suženjem krvnih sudova (54). S obzirom na to da M2 makrofagi imaju predominantno antiinflamatornu ulogu i da su uključeni u popravku oštećenog tkiva, stvaranje fibroznog tkiva i novih krvnih sudova, njihova uloga u ovom procesu je potpuno razumljiva. To je i demonstrirano u jednoj studiji gde je pokazano da nakon godinu dana od transplantacije bubrega, 92% makrofaga koji su infiltrirali kalem imaju $CD68^+CD206^+$ M2 fenotip (55). Međutim, postoji i mišljenje da do vaskularnog oštećenja kod hroničnog odbacivanja dolazi posredstvom eikozanoida, proteaza, ROK i ROA koje prvenstveno stvaraju M1 makrofagi (56). Uzimajući u obzir rezultate dosadašnjih istraživanja, veoma je teško

doneti jednoznačan zaključak o tome koja populacija makrofaga je prisutna kod hroničnog odbacivanja kalema. Moguće objašnjenje je da makrofagi predstavljaju heterogenu populaciju ćelija koja pod određenim uslovima, u toku hroničnog odbacivanja bubrega, može menjati fenotipske karakteristike ili čak ispoljavati osobine obe subpopulacije (57).

1.4.3. Uloga citokina u transplantaciji bubrega

Citokini su mali solubilni glikoproteini koje sekretuje veliki broj ćelija pri čemu njihov glavni izvor predstavljaju leukociti. Citokini predstavljaju važnu kariku između urođene i stečene imunosti. Postoje brojne podele citokina, ali najčešća klasifikacija koja se može naći u literaturi je na osnovu njihove funkcije. Stoga, oni se mogu podeliti na: 1) proinflamatorne kao što su TNF, IL-1 beta, IFN-gama, IL-6, IL-12, IL-17 i IL-18; i 2) antiinflamatorne kao što su IL-10, IL-13, IFN-alfa i faktor transformacije rasta (TGF)-beta. Ova podela je relativno neprecizna jer postoje citokini koji mogu imati dvojaku ulogu (proinflamatornu i antiinflamatornu) kao što je to na primer IL-6.

Neposredno nakon transplantacije bubrega, indukuje se zapaljenski odgovor na kalem zbog nastale hiruške traume. Citokini upravljaju ovim imunskim odgovorom kroz složenu kaskadu događaja koja uključuje infiltraciju antigen-prezentujućih ćelija i limfocita u presađeni bubreg. Tokom rane faze odbacivanja kalema, T-limfociti produkuju brojne citokine među kojima je dominantan IL-2. Ovaj citokin predstavlja faktor rasta T-limfocita jer svojim autokrinim i parakrinim delovanjem indukuje snažnu proliferaciju ovih ćelija. Citokinski milje, koji preovlađuje u mikrosredini transplantiranog organa, u velikoj meri određuje intenzitet imunskog odgovora na kalem ali ujedno usmerava i diferencijaciju pomoćničkih T-limfocita u pravcu Th1, Th2 ili Th17 imunskog odgovora.

Glavni citokin koji determiniše razvoj Th1 ćelija je IL-12. Uprkos prominetnoj ulozi ovog citokina u zapaljenskim procesima, njegova uloga u transplantaciji bubrega je relativno slabo ispitana. Dve studije su pokazale da povišene vrednosti IL-12 u serumu mogu poslužiti kao potencijalni biomarker akutnog odbacivanja odnosno lošijeg dugoročnog preživljavanja kalema (58,59). Ovaj citokin, kojeg sekretuju aktivirane dendritske ćelije, monociti i makrofagi, snažno stimuliše T-limfocite da stvaraju IFN-gama što dalje doprinosi Th1 polarizaciji imunskog odgovora.

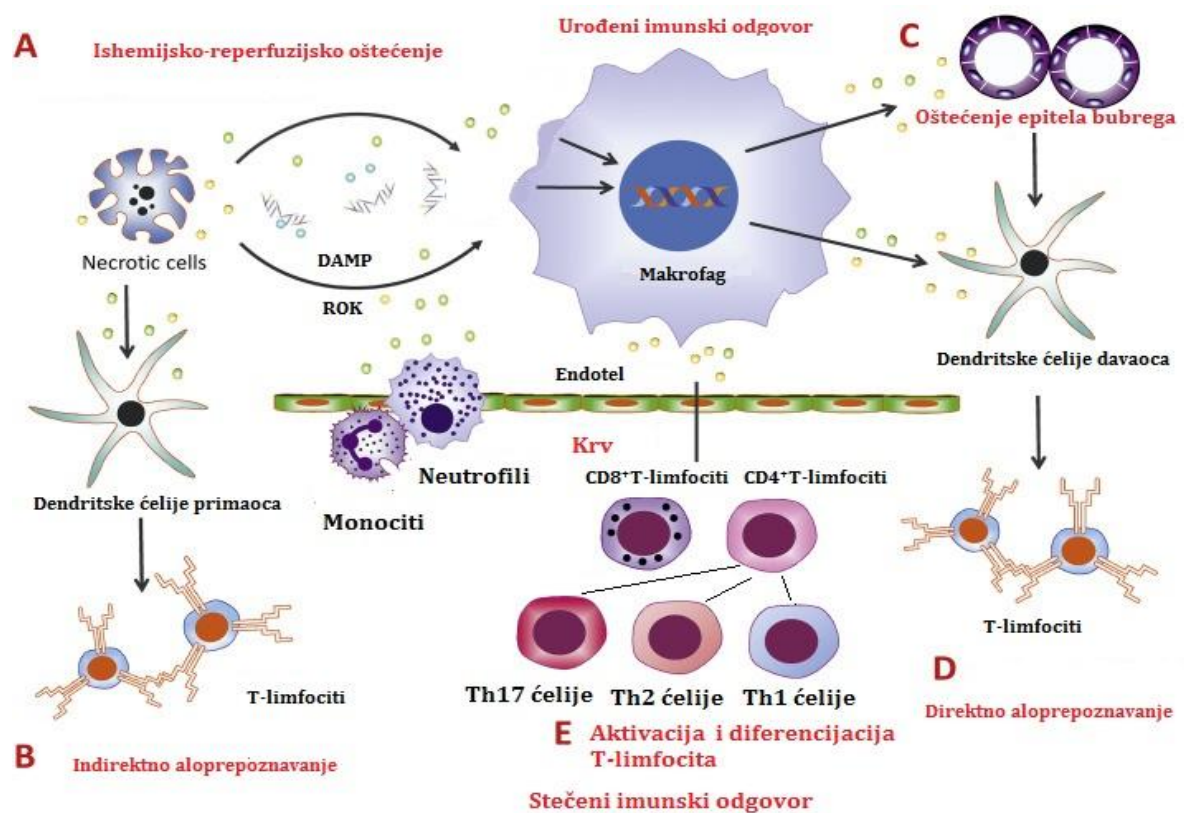
Za razliku od IL-12, podaci o ulozi IFN-gama u transplantaciji bubrega su brojniji. Ispitivanje nivoa IFN-gama u serumu bolesnika sa transplantiranim bubregom datira još od osamdesetih godina prošlog veka gde je utvrđena korelacija između visoke koncentracije IFN-gama i akutnog odbacivanja bubrega (60). U drugim studijama u kojima merena ekspresija *IFNG* gena takođe je pokazano da neposredno pre odbacivanja alokalema dolazi do povećanog prepisivanja informacione RNK (iRNK) ovog gena (61,62). IFN-gama sekretuje ćelije urođene i stečene imunosti (NK ćelije, Th1 ćelije i citotoksični CD8⁺ T-limfociti). Plejotropno dejstvo ovog citokina ispoljava se i na ćelije koje ne spadaju u ćelije imunskog sistema. Tako na primer, IFN-gama i TNF mogu da ushodno regulišu ekspresiju MHC molekula II klase na ćelijama koje ne spadaju u profesionalne antigen-prezentujuće ćelije (npr. epitelne ćelije proksimalnog tubula) i time pojačavaju imunski odgovor na presađeni bubreg (63). To je specifično i pokazano u dve odvojene studije na primeru akutnog i hroničnog odbacivanja bubrega (64,65). TNF i faktor rasta vaskularnog endotela (*engl.* vascular endothelial growth factor, VEGF) deluju sinergistički čime značajno doprinose odbacivanju alokalema (66,67). Ovo delovanje je ispoljeno na taj način što VEGF povećava permeabilnost krvnih sudova dok TNF stimuliše ekspresiju hemokinskih receptora i adhezivnih molekula pospešujući migraciju limfocita kroz vaskularni endotel u intersticijum presađenog bubrega. Interesantno je pomenuti da je nekoliko autora u svojim istraživanjima detektovalo značajno više vrednosti TNF u plazmi bolesnika koji su imali AO u odnosu na bolesnike koji nisu imali ovu komplikaciju (64,68). Nakon susreta sa aloantigenima kalema, naivni T-limfociti se aktiviraju i dalje produkcijom citokina pojačavaju imunski odgovor. Pokazano je u nekoliko studija da dominantan Th1 imunski odgovor koreliše sa većom incidencijom DGF (69) kao i lošijim preživljavanjem transplantiranog bubrega (70).

IL-6 je još jedan od citokina koji su od posebnog interesa za izučavanje u transplantaciji bubrega. Njega sintetišu T-limfociti i makrofagi u toku akutne faze zapaljenja. U nekoliko studija je utvrđena povezanost AO i visokih nivoa IL-6 u serumu/plazmi odnosno urinu (71,72). Slično, analizom bioptata bubrega kod pacijenata koji su imali akutno odbacivanje pokazana je povišena ekspresija *IL6* gena (73). Ove nalaze, treba razmatrati uz dozu opreza jer ovaj citokin može biti izrazito povišen u infekciji, akutnoj tubularnoj nekrozi kao i nakon primenjene imunosupresivne terapije (74).

U toku Th2 imunskog odgovora stvaraju se predominantno antiinflamatorni citokini. U eksperimentalni modelima pokazano je da jedan od ovih citokina, IL-10, inhibiše funkciju antigen-prezentujućih ćelija, zatim smanjuje produkciju TNF i ekspresiju ICAM-1 (75,76). Kao rezultat ovakvog delovanja smanjuje se migracija leukocita i redukuje zapaljenje. Jedna od prvih studija na miševima, kod kojih je uklonjen gen za IL-10, pokazala je da ove životinje imaju ubrzano odbacivanje presađenog bubrega (77). Novija istraživanja su pokazala da narušen balans u produkciji IL-10/TNF kod posebne populacije B-limfocita (tranzicijski B-limfociti) može biti uzrok nedovoljne imunске supresije i akutnog oštećenja alokalema (78). IL-10 se pokazao kao posebno interesantan jer postoje brojni radovi koji ga povezuju sa imunskom tolerancijom. Imunska tolerancija se može objasniti unutar koncepta transplantacije kao stanje kod koga presađeni organ održava svoju funkciju uz odsustvo ili pak minimalnu primenu imunosupresivne terapije. S obzirom da se organizam primaoca izlaže stranim antigenima u toku transplantacije organa od nepodudarnog davaoca, neizbežno će se javiti imunski odgovor na alokalem. U većini slučajeva, usled odsustva imunске supresije, pokrenuće se imunski odgovor koji će oštetiti i odbaciti kalem. Postoji nekoliko modela koje objašnjavaju ovaj fenomen, ali u većini njih, okosnicu predstavlja IL-10. Naime, smatra se da T-limfociti usled nedovoljne aktivacije (u prisustvu TGF-beta i IL-10) (79) i nedovoljne koncentracije faktora potrebnih za njihovo preživljavanje (odsustvo IL-7 i IL-15) postaju tolerantni na sopstvene antigene (80). Posebna subpopulacija pomoćničkih CD4⁺T-limfocita, Treg, predstavljaju sinonim za imunsku toleranciju. Ove ćelije takođe luče IL-10 i ekspimiraju na svojoj površini IL-2R (receptor za IL-2) kojim vrše depleciju IL-2 čime dodatno suprimiraju imunski odgovor. Eksperimentalnu potvrdu imunomodulatorne uloge Treg ćelija dali su Hu i sar. na modelu miša kome je presađen bubreg (81). Oni su pokazali da Treg ćelije infiltrišu alokalem i u njemu luče velike količine TGF-beta i IL-10. Na ovaj način ove ćelije svojim imunosupresivnim delovanjem potencijalno mogu da produže preživljavanje transplantiranog bubrega.

Do skora se smatralo da Th1/Th2 balans predstavlja glavni mehanizam u odbacivanju alokalema. Međutim, u novijoj literaturi postoji sve veće interesovanje za Th17 ćelije i njihovu ulogu u transplantaciji bubrega (82). Za diferencijaciju ovih ćelija neophodna su TGF-beta, IL-6, IL-21 i IL-23. Jedan od glavnih citokina koji produkuju ove ćelije je IL-17. Ispitivanja na životinjskim modelima pokazala su da tokom akutnog

odbacivanja postoji povećana sinteza iRNK za IL17 kao i samog proteina. Slični rezultati su dobijeni u još dve studije gde su analizirani pomenuti parametri sa subkliničkim odbacivanjem bubrega (83,84). Moguće objašnjenje leži u tome da ovaj citokin regrutuje veliki broj neutrofila koji infiltriraju kalem tokom AO što je i potvrđeno nalazima biopsije nakon transplantacije srca (85). Dodatno, demonstrirano je da epitelne ćelije bubrega mogu da proizvode medijatore zapaljenja pod uticajem IL-17 i time doprinesu ranom odbacivanju bubrega (84). Na slici 1. se nalazi pojednostavljen prikaz imunskog odgovora na alokalem.



Slika 1. Imunski odgovor na kalem. A) ishemijsko–reperfuzijsko oštećenje; oštećene ćelije bubrega oslobađaju DAMP molekule, reaktivne oblike kiseonika (ROK) i citokine koji aktiviraju ćelije imunskog odgovora (npr. makrofage). B) Dendritske ćelije primaoca preuzimaju antigene kalema i prezentuju ih aloreaktnim T-limfoctima (indirektno aloprepoznavanje); pod dejstvom hemokina i citokina neutrofilii i monociti se aktiviraju i migriraju u kalem. C) Monociti koji su infiltrirali kalem luče citokine i ROK čime dodatno oštećuju epitel bubrega. D) Iz oštećenih ćelija kalema oslobađaju se antigeni koje preuzimaju dendritske ćelije davaoca i prezentuju ih T-limfocitima primaoca (direktno aloprepoznavanje). E) Citokinski milje koji preovlađuje u kalem uslovljava dalju diferencijaciju u pravcu Th1, Th2 i Th17 ćelija. Modifikovano prema referenci (86).

Uloga citokina u transplantaciji je nedvosmisleno veoma značajna i ovim se njihova lista ne završava. Zbog postojanja velikog broja citokina i njihove kompleksne uloge u imunskom odgovoru na transplantirani bubreg, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivanje će prvenstveno biti usredsređeno na gene, odnosno genske varijacije, za TNF, IL-6, IFN-gama, IL-10 i IL-12/23.

1.4.1. Polimorfizmi gena za citokine

Genske varijacije ili polimorfizmi imaju najveći uticaj upravo na imunski sistem čoveka i posledica su evolutivne adaptacije organizma na faktore makro i mikrosredine. Najubedljiviji dokaz za to je svakako HLA lokus koji je najpolimorfniiji u čovekovom genomu. Polimorfizmi predstavljaju normalne varijacije u DNK molekulu koje se mogu naći kod ljudi u opštoj populaciji. Smatra se da je polimorfni DNK lokus mesto na kome postoje najmanje dva oblika gena (alela), pri čemu najređi ima frekvenciju veću od 1%. Mutacijma se smatraju oni aleli čija je frekvencija manja od 1% (87). Polimorfizmi se najčešće mogu javiti u nekoliko formi: polimorfizmi na nivou jednog nukleotida (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP), varijabilan broj tandem ponovaka (*engl.* variable tandem repeats), mikrosateliti i inserciono/delecioni polimorfizmi. Samo mali broj polimorfizama se nalazi u kodirajućim delovima DNK molekula i kao posledicu ima zamenu aminokiseline u proteinu. Većina polimorfizama, naročito onih u genima za citokine, nalazi se u promotoru gena, 3' netranslirajućem regionu ili intronima. Polimorfizmi koji se nalaze u promotoru mogu onemogućiti vezivanje transkripcionih faktora i na taj način uticati na ekspresiju gena. Funkcionalan značaj mogu imati i polimorfizmi u 3' netranslirajućem regionu pri čemu menjaju stabilnost iRNK i tako utiču na sintezu proteina (88). Varijacije u genima za citokine, kao što su SNP, mogu dovesti do promene u sintezi ovih medijatora, kao i promene u prenosu signala unutar ćelije i time modulirati imunski odgovor.

Identifikacija genetičkih faktora koji regulišu jačinu imunskog odgovora na kalem mogla bi biti od velike pomoći prilikom procene rizika od odbacivanja organa odnosno boljeg dizajniranja terapije.

1.4.1.1. Polimorfizam rs1800629 u genu TNFA

Gen za TNF (*TNFA*) se nalazi u okviru lokusa HLA III klase, na hromozomu 6 u regionu p21.3 i kodira protein od 212 aminokiselina. Proteolitičkim razlaganjem ovog molekula i formiranjem trimera dobija se sekretorna forma ovog proteina. U

transplantaciji bubrega, jedan od najčešće ispitivanih SNP *TNFA* gena nalazi se u regionu promotora na poziciji -308 (G/A) (rs1800629). Pokazano je da tranzicija guanina (G) u adenin (A) utiče na ekspresiju TNF proteina (89). Prisustvo AA i AG genotipa je povezano sa povećanom aktivnošću transkripcije i sintezom TNF u *in vitro* uslovima (90). Dosadašnja istraživanja su bila usmerena na ispitivanje povezanosti ovog polimorfizma i ishoda transplantacije (akutno odbacivanje, hronično odbacivanje i odložena funkcija kalema). Rezultati koji su dobijeni iz pojedinačnih transplantacionih centara nisu bili jednoznačni (87,91-93). Jedna od prvih velikih genetičkih studija asocijacije, koja je urađena na 2298 bolesnika sa transplantiranim bubregom, pokazala je da postoji povezanost između genotipova sa visokom produkcijom TNF i lošijim preživljavanjem kalema (94). U dve meta-analize koje su sprovedene 2008. i 2011. godine dobijeni su neujednačeni rezultati. U prvoj meta-analizi, Thakkestian i saradnici nisu ustanovili postojanje povezanosti između ovog SNP i AO (95). Međutim, novija meta-analiza, koja je sadržala i podatke iz studija u proteklom periodu, ukazala je da postoji udruženost ovog lokusa sa AO (96).

1.4.1.2. Polimorfizam rs1800795 u genu *IL6*

Gen za IL-6 (*IL6*) se nalazi na hromozomu 7 u regionu p21.5 i kodira protein dužine 184 aminokiseline. Polimorfizam na poziciji -174 G/C (rs1800795) u regionu promotora gena za IL-6 predstavlja tranziciju guanina u citozin, što kao rezultat ima smanjenu ekspresiju ovog citokina u serumu i plazmi (97). Studije asocijacije pokazale su da ovaj SNP ima potencijal da posluži kao biomarker AO i dužeg preživljavanja kalema mada ni u ovom slučaju ne možemo reći da postoji konsenzus među istraživačima. Iz literature možemo, na primer, izdvojiti studije Tajik i sar. i Kocirz i sar. (98,99) koji su utvrdili da postoji udruženost GG ili GC genotipa i povoljnijeg kliničkog ishoda nakon transplantacije bubrega. Interesantno je pomenuti da su Canossi i sar. pokazali da GG genotip donora doprinosi značajno manjem odbacivanju bubrega kod primaoca (100).

1.4.1.3. Polimorfizam rs2430561 u genu *IFNG*

Gen za IFN-gama (*IFNG*) nalazi se na hromozomu 12q15 i kodira protein dužine 166 aminokiselina. Najbolje proučeni polimorfizam je SNP +874 T/A (rs2430561) u intronu 1. Supstitucija adenina (A) u timin (T) na poziciji +874 od startnog mesta transkripcije je povezana sa navodnim mestom vezivanja transkripcionog faktora NF-

κB i povećanom ekspresijom *IFNG* (101). Alel T kao i genotip TT se indirektno dovode u vezu sa povećanom produkcijom IFN-gama (101). Nekoliko studija je pokazalo povezanost ovog SNP sa akutnim odbacivanjem ili hroničnom nefropatijom alokalema bubrega (102-104).

1.4.1.4. Polimorfizmi *rs1800896*, *rs1800871* i *rs1800872* u genu *IL10*

Gen za IL-10 (*IL10*) se nalazi na hromozomu 1 u regionu q32.2, i kodira protein od 178 aminokiselina. U genu *IL10* je do sada identifikovano preko 40 SNP. Najpoznatiji i najzastupljeniji u literaturi su polimorfizmi u promotoru ovog gena na pozicijama -1082 G/A (*rs1800896*), -819C/T; (*rs1800871*) i -592C/A (*rs1800872*). Ova tri SNP formiraju nekoliko haplotipova od kojih su tri najčešća haplotipa opisana kod pripadnika bele rase (GCC, ACC i ATA). U funkcionalnim ispitivanjima pokazano je da supstitucija G u A na poziciji -1082 smanjuje sposobnost vezivanja transkripcionih faktora za promotor mada je većina istraživača sklonija da intenzitet sinteze IL-10 koreliše sa odgovarajućim haplotipovima: velika (GCC/GCC), umerena (GCC/ACC ili GCC/ATA) i mala produkcija (ATA/ATA) (105,106). I kod ovih polimorfizama postoje kontradiktorni rezultati kada se upoređuju nalazi pojedinačnih studija (93,107-109). Međutim, u meta-analizi koja je uključivala 1087 pacijenata iz 8 transplantacionih centara, utvrđena je povezanost između klinički lošeg ishoda (akutno ili hronično odbacivanje kalema) i IL-10 ACC haplotipa (95). Slično, velika multicentrična studija je pokazala da individue koje su homozigoti za -592A SNP *IL10* imaju pet puta veću šansu da imaju AO bubrega u odnosu na druga dva genotipa (110).

1.4.1.5. Polimorfizam *rs3212227* u genu *IL12B*

Gen *IL12B* se nalazi na hromozomu 5 u regionu q33.3 i kodira subjedinicu p40 koja je zajednička za IL-12 i IL-23. Polimorfizmi ovog gena potencijalno mogu uticati i na IL-12/Th1 i na IL-23/Th17 imunski odgovor. Jedan od SNP u ovom genu je i +1188A/C (*rs3212227*). Smatra se da je ovaj SNP funkcionalan i da utiče na ekspresiju oba citokina. U nekoliko studija je pokazano da transverzija adenina (A) u citozin (C) rezultira povećanom ekspresijom p40 i sekrecijom IL-12 (111-113). Konačni sud o fenotipskom efektu ovog SNP ne može se doneti sa sigurnošću jer postoje i nalazi koji govore u prilog tome da su A alel i AA genotip odgovorni za povišenu ekspresiju ovih proteina (114,115). Do sada, u literaturi postoji svega nekoliko studija koje su ispitivale ulogu +1188A/C *IL12B* SNP u transplantaciji bubrega i nijedna nije utvrdila povezanost ovog

SNP sa kliničkim ishodima (preživljavanje bolesnika, hronično odbacivanje kalema, AO i DGF)(116-119).

1.5. Imunosupresivna terapija u transplantaciji bubrega

Upotreba moderne imunosupresivne terapije je napravila revoluciju u transplantaciji bubrega. Primenom imunosupresivnih lekova incidencija akutnog odbacivanja se dramatično smanjila u prvim mesecima nakon transplantacije. Danas, akutno odbacivanje presađenog bubrega je sve ređe posledica nedovoljno kontrolisanog imunskog odgovora. Najveći doprinos ovome, verovatno, imaju ciklosporin i takrolimus, lekovi iz klase kalcineurinskih inhibitora.

Ciklosporin je prvi uveden kao deo imunosupresivne terapije sedamdesetih godina prošlog veka. Po hemijskoj strukturi je ciklični peptid koji se sastoji od 11 amino kiselina i prirodni je produkt gljivice *Tolypocladium inflatum* (120). Ovaj lek se vezuje za intracelularni protein ciklofilin-A što će sledstveno inhibirati proteinsku fosfatazu kalcineurina. Inhibicija kalcineurina onemogućava fosforilaciju nuklearnog faktora aktiviranih T-ćelija (*engl.* Nuclear factor of activated T cells, NFAT) koji predstavlja transkripcioni faktor za nekoliko gena (*IL2, IL4, IFNG*) važnih za aktivaciju i proliferaciju T-limfocita. Ciklosporin ima veliku varijabilnost u farmakokinetici i njegova biodostupnost je 25-30% nakon oralne primene (121). U organizmu on se distribuira uglavnom u eritrocite i leukocite, dok se svega 4% leka nalazi slobodno u plazmi gde je većinom vezan za proteine (122).

Nakon ciklosporina, petnaest godina kasnije, uveden je i takrolimus koji je do današnjih dana ostao lek izbora u transplantacionoj medicini za većinu kliničara. Ovaj lek pripada grupi makrolidnih antibiotika koje stvaraju *Streptomyces tsukubaensis*. Glavni mehanizam njegovog delovanja je sličan ciklosporinu i uključuje inhibiciju kalcineurina, sa razlikom da se takrolimus primarno vezuje za tzv. FK-vezujući protein u ćeliji. Farmakokinetiku i ovog kalcineurinskog inhibitora karakteriše slaba biodostupnost nakon oralne primene. Iako se dobro distribuira u krv i ostala tkiva, preko 90% leka u plazmi vezano je za proteine. Takrolimus je smanjio incidenciju AO na ispod 20% u prvoj godini nakon transplantacije, dok je preživljavanje kalema unutar prve godine bilo 90%. (123).

Danas se u imunosupresivnoj terapiji, pored kalcineurinskih inhibitora, najčešće koriste purinski analozi (azatioprin), inhibitori mTOR (*engl.* mammalian target of rapamycin, mTOR) (rapamicin) i inhibitor inozin 5'-monofostat dehidrogenaze (preparati mikofenolične kiseline). Ovi lekovi se upotrebljavaju kao deo kombinovane terapije kako bi se postigli bolji terapeutske efekti i smanjila njihova neželjena dejstva.

Estri i soli mikofenolične kiseline (MFK) često čine deo terapije u kojoj su uključena još dva leka za imunske supresiju: jedan od kalcineurinskih inhibitora i kortikosteroid. Ovakav vid terapije je primenjen i u našoj studiji. MFK je izolovana iz *Penicillium stoloniferum* i ona deluje kao selektivni, nekompetitivni i reverzibilni inhibitor inozin 5'-monofosfat dehidrogenaze (*engl.* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH). IMPDH katalizuje *de novo* sintezu nukleotida guanozina koji je neophodan za ćelijsku deobu T i B- limfocita (124). Farmakokinetika MFK je veoma kompleksna (125). Nakon oralne primene leka, neaktivna forma MFK, pod dejstvom nekoliko enzima, prelazi u jednu od nekoliko aktivnih formi, kao što je acil-glukuronid mikofenolične kiseline (126). MFK i njeni metaboliti se izlučuju putem žuči i delom putem bubrega. Do sada je opisan veliki broj proteina koji transportuju ovaj lek kroz membranu hepatocita, među kojima su jedni od najdetaljnije ispitanih membranski transporter organskih anjona polipeptid 1B1 i 1B3 (*engl.* organic anion-transporting polypeptide, OATP) i protein povezan sa multirezistencijom na lekove (*engl.* multidrug resistance-associated protein 2, MRP2) (127,128).

Nakon višedecenijske upotrebe imunosupresivnih lekova, sagledane su i negativne strane ovakve terapije. Uprkos velikim očekivanjima, ona nije imala efekte na dugoročno preživljavanje transplantiranog organa. Pored kratkoročnog uticaja na preživljavanje, ovi lekovi su pokazali i ozbiljna neželjena dejstva, uključujući, paradoksalno, i oštećenje presađenog organa (nefrotoksični efekat). Neki lekovi, naročito takrolimus, povezani su još i sa povećanim rizikom od nastanka dijabetesa nakon transplantacije (129). Danas se zna da dijabetes nastao pre transplantacije, kao i onaj koji je nastao nakon transplantacije, predstavlja snažan prediktivni faktor kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (130). Neadekvantna, suboptimalna imunska supresija može dovesti do odbacivanja transplantiranog organa ali isto tako prekomerna može dovesti do pojave infekcije kod bolesnika. Intezivna primena tri leka: kalcineurinskog inhibitora, preparata mikofenolične kiseline i prednizolona, može dovesti do reaktivacije Polyoma virusa i nefropatije kod oko 5% transplantiranih

pacijenata (131). U odsustvu specifičnih biomarkera koji bi ukazivali na infekciju i toksičnosti leka, dobra klinička procena i iskustvo lekara imaju veliki značaj u terapijskom praćenju bolesnika koji primaju imunospresivnu terapiju tokom dužeg vremenskog perioda.

1.5.1. Proteini koji utiču na terapijsku efikasnost imunosupresivnih lekova

Postizanje optimalnog balansa između terapijske efikasnosti i neželjenih efekata leka predmet je velikog interesovanja i izučavanja više biomedicinskih disciplina, poput farmakogenetike, proteomike i metabolomike. Kompleksnost ovog problema se može najbolje sagledati u činjenici da veliki broj faktora, kao što su genetički, sredinski, i faktori vezani za samu bolest, mogu uticati na terapijsku efikasnost imunosupresivnih lekova. Poznato je da ovi lekovi imaju veliku varijabilnost u farmakokinetici i farmakodinamici, kao i da farmakokinetički profil jednog leka određuju brojni enzimi koji taj lek metabolišu ili pak proteini koji ga transportuju. U ovu grupu molekula spadaju citohromi P450, OATP1B1, P-glikoprotein, i drugi.

U toku metabolizma lekova odigravaju se brojne biohemijske reakcije. U nekim od tih reakcija vrši se konverzija lekova u metabolite koji su bolje restvorljivi u vodi čime se olakšava njegovo izlučivanje van organizma. Takođe, neaktivne forme leka (prolek) se mogu posredstvom enzima prevesti u terapijski aktivne forme ili čak metabolite toksične za organizam. U farmakologiji, biohemijske reakcije koje se dešavaju u toku metabolizma lekova podeljene su u dve faze: faza 1 (oksidacija, redukcija i hidroliza) i faza 2 (reakcije konjugacije; acetilacija, sulfatacija, glukuronizacija, metilacija itd.). Nazivi reakcija ne ukazuju na njihov redosled jer reakcije faze 2 mogu prethoditi reakcijama faze 1, i često se se mogu dešavati bez prethodne oksidacije, redukcije ili hidrolize.

Citohromi P450 (CYP) pripadaju superfamiliji mikrozomalnih enzima i spadaju u najvažnije enzime koji katalizuju metabolizam lekova u toku faze 1. U okviru ove superfamilije, najznačajniju i najzastupljeniju grupu enzima koji metabolišu lekove čine članovi CYP3A podfamilije. Oni su eksprimirani u jetri, mukozi tankog creva i bubrezima, i time značajno učestvuju u absorpciji, prvom prolasku leka nakon oralne primene kao i eliminaciji leka iz organizma (132,133). CYP3A4 je glavni enzim ove podfamilije i stvaraju ga ćelije jetre i tankog creva. Varijacije u genu koji kodira ovaj protein nisu česte i imaju relativno ograničen uticaj na njegovu funkciju (132). S druge strane, CYP3A5 je

ekspimiran u većem broju tkiva kod čoveka mada postoje i populacije ljudi kod kojih ovaj enzim nije prisutan. *In vitro* eksperimenti su pokazali da oba ova enzima metabolišu takrolimus (134,135).

Proteini koji transportuju lekove imaju važnu ulogu u regulaciji njihove absorpcije i distribucije u organizmu, kao i ekskrecije. Nakon oralne primene, lek prolazi kroz zid creva i krvotokom portalne vene dolazi u jetru, odakle odlazi u sistemska cirkulaciju kojom se dalje distribuira u različita tkiva. Tokom ovih farmakokinetičkih procesa lek prolazi kroz nekoliko bioloških membrana. Njegove fizičko-hemijske karakteristike, kao što su veličina molekula, lipofilnost i naelektrisanje, diraju dinamiku kretanja kroz membrane ćelija. Prisustvo transportnih proteina u ćelijskoj membrani može olakšati ali isto tako i onemogućiti prolazak leka (136). Ovi proteini se na osnovu svoje funkcije mogu podeliti u dve grupe: one koji ubacuju molekule u ćeliju (vrše inluks) i one koje ih izbacuju (vrše efluks). Veliku grupu proteina koji ubacuju lekove u ćeliju čine članovi grupe polipeptidnih transportera organskih anjona (*engl.* organic anion-transporting polypeptide, OATP). Od jedanaest OATP proteina koji su prisutni kod čoveka, OATP1B1, OATP1B3 i OATP2B1 su ekspimirani na sinusoidalnoj membrani hepatocita gde olakšavaju preuzimanje lekova u jetru. Do danas je pokazano da su ovi proteini uključeni u transport većeg broja lekova koji su u kliničkoj upotrebi. Među njima se nalaze i aktivni metaboliti MFK, acil-glukuronid i fenil-glukuronid mikofenolične kiseline (137).

Na terapijsku efikasnost MFK mogu uticati i drugi proteini koji nisu direktno povezani sa njenim metabolizmom i transportom. IMPDH je jedan od njih i predstavlja ključni enzim u *de novo* sintezi purinskih baza koji je ujedno i glavna meta na koju deluje MFK. Postoje dve izoforme ovog enzima IMPDH1 i IMPDH2 koje kodiraju različiti geni (*IMPDH1* i *IMPDH2*). Smatra se da ova dva enzima imaju identičnu funkciju, sa razlikom u tome da je IMPDH2 dominantno ekspimiran u aktiviranim limfocitima (138). Farmakodinamski efekti MFK mogu se pratiti merenjem aktivnosti IMPDH enzima (139). I zaista, pokazano je da nakon terapije MFK postoje velike individualne razlike u inhibiciji IMPDH enzima a samim tim i razlike u efikasnosti ovog leka (140,141). Jedno od mogućih objašnjenja za postojanje tih razlika jeste i uticaj genskih varijacija, poput polimorfizama pojedinačnih nukleotida, u genima koji kodiraju *IMPDH1* i *IMPDH2*, na aktivnost ovih enzima i, posredno, na razlike u farmakodinamici i farmakokinetici MFK.

Tome u prilog govori nekoliko studija koje su našle asocijaciju određenih SNP u *IMPDH1* i *IMPDH2* genima sa različitom terapijskom efikasnošću MFK (142-144)

1.5.2. Polimorfizmi u genima *CYP3A5*, *IMPDH1* i *SLCO1B1*

Farmakogenetika predstavlja naučnu disciplinu koja izučava genetičke mehanizme koji utiču na individualne razlike u odgovoru na terapiju lekovima. Genetičke razlike između individua prisutne su u humanom genomu na svakih 300-1000 nukleotida i do sada je identifikovano preko 335 miliona različitih SNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi, pristupljeno dana 19.06.2018. godine). U novijoj literaturi akumulirao se veliki broj dokaza koji potvrđuju značajnu ulogu farmakogenetičkih studija u transplantaciji bubrega. Rezultati istraživanja SNP u okviru gena *CYP3A5*, *IMPDH1* i *SLCO1B1* su ukazali na potencijal ovih polimorfizama kojim mogu biti od pomoći prilikom određivanja optimalne terapije (145).

1.5.2.1. Polimorfizam *rs776746* u genu *CYP3A5*

CYP3A5 gen se nalazi na hromozomu 7q22.1 i kodira protein CYP3A5 (citohrom P450 familije 3 podfamilije A član 5). Supstitucija A u G na poziciji +6986 (*rs776746*, označava je još i kao *CYP3A5*3*) u intronu 3 ovog gena rezultira defektom u obradi iRNK i odsustvom proteinske aktivnosti CYP3A5. Funkcionalna varijanta koja ima A alel na ovoj poziciji, označena kao *CYP3A5*1*, ima normalnu aktivnost proteina. Nosioци jednog ili oba funkcionalnog alela, *CYP3A5*1*3* i *CYP3A5*1*1*, se u literaturi označavaju kao „ekspresori“ (*engl. expressors*) jer se kod njih stvara funkcionalni protein (146). U nekoliko studija pokazano je da CYP3A5 „ekspresori“, zahtevaju veće doze takrolimusa za održavanje željene koncentracije u krvi u odnosu na individue koje ovaj protein ne eksprimiraju (147). Takođe, u azijskoj populaciji utvrđeno je da nosioци *CYP3A5*1* alela imaju značajno veću šansu da odbace transplantirani bubreg u odnosu na ispitanike koji nemaju ovaj alel (148).

1.5.2.2. Polimorfizam *rs2278294* u genu *IMPDH1*

IMPDH1 gen se nalazi na hromozomu 7q32.1 i kodira inozin 5'-monofosfat dehidrogenazu 1 (*IMPDH1*). Jedni od najčešće ispitivanih polimorfizama u okviru transplantacije bubrega su polimorfizmi *rs2278293* (+125G/A) i *rs2278294* (-106G/A G/A) koji se nalaze u introna gena *IMPDH1*. Nekoliko studija je pokazalo da SNP u ovom

genu mogu uticati na imunski odgovor i efikasnost terapije MFK, a samim tim i na akutno odbacivanje kalema. U istraživanju, koje je obuhvatilo 456 pacijenta sa transplantiranim bubregom, utvrđeno je da postoji povezanost između SNP rs2278294 i manjeg rizika od odbacivanja kalema, ali i većeg rizika od leukopenije u prvoj godini nakon transplantacije (149). Slično, u još jednoj studiji je pronađena asocijacija između ova dva SNP i AO (150). Međutim, potvrda udruženosti ovih genskih varijanti i AO je izostala u do sada najvećoj kolaborativnoj studiji Shah i saradnika iz 2012. godine (151). Za ispitivanje u našoj studiji odabran je SNP rs2278294 koji se u pomenutoj studiji pokazao kao SNP koji ima veći potencijal da bude udružen sa AO.

1.5.2.3. Polimorfizmi rs2306283 i rs4149056 u *SLC01B1* genu

SLC01B1 gen se nalazi na hromozomu 12p12.2 i kodira membranski transporter organskih anjona polipeptid 1B1 (*engl.* organic anion-transporting polypeptide 1B1, OATP1B1). Ovaj gen čini 15 egzona i do sada je identifikovano 190 genskih varijanti čija frekvencija je veća od 5% (152). OATP1B1 je uključen u transport velikog broja endogenih supstanci i lekova među koje spada i MFK. Dva najpoznatija SNP, rs2306283 (+388A/G) i rs4149056 (+625T/C) se nalaze u parcijalnoj neravnoteži povezanosti (LD, *engl.* linkage disequilibrium) koja predstavlja fenomen da se dva alela nasleđuju zajedno češće nego što bi to bio proizvod slučajnosti, pri čemu mogu da grade četiri haplotipa: *SLC01B1*1B* (388G-521T), *SLC01B1*1A* (388A-521T), *SLC01B1*15* (388G-521C), *SLC01B1*5* (388A-521C). Oba SNP spadaju u tzv. nesinonimne polimorfizme jer se nalaze u egzonomima i dovode do promene u ugradnji aminokiseline u polipeptid. Na primer, SNP +388A/G ima za posledicu da se u proteinu OATP1B1, aminokiselina asparagin, menja u glutaminsku kiselinu na poziciji 130 dok SNP +625T/C kodira promenu aminokiseline valin u alanin na poziciji 174. *In vitro* ispitivanje na humanim embrionalnim ćelijama bubrega HEK 293 ćelijama (*engl.* human embryonic kidney cells, HEK), pokazalo je da postoji povezanost između *SLC01B1*5* i sniženog transporta aktivnih metabolita MFK kroz ćelijsku membranu. U istoj studiji pokazano je i da su transplantirani pacijenti sa TT genotipom u okviru SNP rs4149056 imali povećan rizik od razvoja neželjenih efekata ovog leka (137).

Napredak savremene medicine nameće trendove koji predlažu da se prilikom dijagnostike i primene terapijskih procedura koristi model individualnog pristupa

pacijentu. Trenutno, u transplantaciji organa, upotreba imunosupresivnih lekova je uglavnom bazirana na generičkim kliničkim protokolima koji zanemaruju velike individualne razlike među pacijentima. Genetičke studije asocijacije, uprkos svojim ograničenjima, imaju veliki potencijal u otkrivanju gena kandidata koji su važni za procese metabolizma i transporta lekova, kao i kontrolu imunskog odgovora na kalem.

Na osnovu svega prethodno navedenog, za planirano ispitivanje odabrali smo sledeće polimorfizme: *TNFA* (-308A/G; rs1800629), *IL6* (-174C/G; rs1800795), *IFNG* (-874 T/A; rs2430561), *IL10* (-1082G/A; rs1800896 i 819C/T-; rs1800871), *IL12B* (+1188A/C, rs3212227), *CYP3A5* rs776746), *IMPDH1* (-106G/A; rs2278294) i *SLCO1B1* (+388A/G; rs2306283 i +625T/C; rs4149056).

2. Ciljevi

Ciljevi istraživanja su sledeći:

1. Odrediti distribuciju alela i genotipova polimorfizama na nivou jednog nukleotida u okviru *TNFA*, *IL6*, *IFNG*, *IL10*, *IMPDH1* i *SLCO1B1* gena u grupi bolesnika sa transplantiranim bubregom kao i *IL10* i *IL6* gena kod zdravih kontrola.
2. Ustanoviti da li je neki od polimorfizama ovih gena povezan sa biohemijskim parametrima funkcije bubrega, odnosno sa nastankom akutnog odbacivanja ili odložene funkcije bubrega.
3. Proceniti da li se distribucije genotipova ispitivanih polimorfizama kod bolesnika sa transplantiranim bubregom razlikuju u ovoj studiji u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u drugim populacijama.

3. Materijal i metode

3.1. Dizajn studije

Retrospektivna kohortna studija je sprovedena u Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Srbije (KCS), analiza genskih polimorfizama, obrada podataka i statistička analiza su urađeni u imunološkoj laboratoriji Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (revidirana verzija iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Odluka br. 29/X-4).

3.2. Ispitanici

U studiju je uključeno 152 bolesnika koji su u periodu od 1986. do 2012. godine podvrgnuti transplantaciji bubrega i koji primaju inhibitor kalcineurina i preparate mikofenolične kiseline, a leče se i kontrolišu u Klinici za nefrologiju Kliničkog centra Srbije. Kontrolnu grupu za određivanje učestalosti alela *IL10* i *IL6* činilo je 250 dobrovoljnih davalaca krvi čija je krv uzeta u Institutu za transfuziju krvi Srbije.

Iz medicinske dokumentacije bolesnika dobijeni su sledeći podaci: 1) demografske karakteristike bolesnika (pol, godine, starost); 2) podaci o osnovnoj bolesti, datum i vrsta transplantacije; 3) HLA haplotip; 3) protokol imunosupresivne terapije; 4) podaci o akutnom odbacivanju i odloženoj funkciji kalema; 4) podaci o nivoima serumskog kreatinina, klirensa kreatinina kao i proteinurije nakon mesec dana, tri meseca, šest meseci, godinu dana i dve godine nakon transplantacije.

Svaki od ispitanika je detaljno obavešten o cilju studije i dobrovoljno je potpisao pristanak za učestvovanje u njoj. Kriterijum za isključenje je bio nepristajanje pacijenta da učestvuje u studiji.

3.2.1. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze akutnog odbacivanja i odložene funkcije kalema

Dijagnoza odložene funkcije kalema je postavljena na osnovu toga da li je postoji potreba za dijalizom kod bolesnika u prve dve nedelje nakon transplantacije burega. Dijagnoza akutnog odbacivanja bubrega je postavljena na osnovu patohistološkog nalaza biopsije bubrega ili na osnovu pogoršanja funkcije alografta koja se oporavlja nakon pulsniha doza glukokortikoida.

3.3. Metode

3.3.1. Uzimanje krvi

Za određivanje genskih polimorfizama, svim ispitanicima je uzimano 5 ml periferne krvi u odgovarajuće epruvete (Becton Dickinson, Nju Džersi, SAD) sa antikoagulansom – EDTA, i unutar 4 h transportovano do Laboratorije za imunologiju, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, gde je krv dalje obrađivana.

3.3.2. Izolacija DNK

Za izolaciju DNK iz krvi ispitanika korišćen je GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) prema uputstvu proizvođača. Pre početka izolacije, puferima za ispiranje (*engl.* Wash buffer, WB) WB I i WB II dodata je propisana količina 100% etanola (Zorka, Šabac, Srbija). Ukratko, krv u „vakutainer“ epruvetama je promešana okretanjem epruvete gore-dole osam puta nakon čega je iz svake uzimano po 200 µl krvi i prenošeno u obeležene ependorf epruvete zapremine 1,5 ml (Sarsted, Nümbrecht, SR Nemačka). Zatim je svakom uzorku dodavano po 400 µl rastvora za liziranje i 20 µl proteinaze K. Nakon toga, svi uzorci su kratko i energično izmešani na orbitalnoj mešalici (vorteksu) i inkubirani 10 minuta u vodenom kupatilu na 56°C uz povremeno mešanje (2-3 puta) okretanjem epruveta gore-dole. U svaki uzorak je potom dodavano po 200 µl 96% etanola (Zorka, Šabac, Srbija), a zatim je smeša energično mešana. Nakon toga, sav sadržaj je prebacivan u prethodno obeležene kolonice koje su bile ubačene u ependorf epruvete od 2 ml sa odsečenim poklopcem (Sarsted, Nümbrecht, SR Nemačka). Sadržaj kolonica je potom centrifugiran 1 minut na 6000g nakon čega su kolonice sa vezanom DNK prebacivane u kivete za otpad koje su sastavni deo GeneJet Genomic DNA Purification kompleta. DNK vezane za matriks kolona su ispirane dodavanjem po 500 µl WB I i centrifugiranjem kolona u trajanju od 1 minut na 8000g. Sadržaj kiveti za otpad je zatim odlivan, a u kolone je dodavano po 500 µl WB II. Nakon toga, kolone su centrifugirane 3 minuta na 14 000g, a ukoliko bi u njima ostalo još tečnosti, centrifugiranje je ponavljano još 1 minut na istoj brzini nakon pražnjenja kiveti za otpad. Kolone sa vezanom DNK su prebacivane u nove obeležene Eppendorf „Safe Lock“ epruvete od 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka) i pristupalo se izdvajanju DNK vezane za matriks kolone na sledeći način: u svaku kolonu

je dodavano 200 μ l pufera za rastvaranje DNK, zatim su kolone inkubirane 2 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirane 1 minut na 8000g. Izolovanim DNK je zatim spektrofotometrijski određivana koncentracija i čistoća.

3.3.1. Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK

Uzorak od 8 μ l izolovane DNK nanošen je u mikrokivetu Gene Quant Pro Calculatora (LKB Pharmacia, Uppsala, Švedska), a zatim su očitavane vrednosti apsorbancije na 230, 260, 280 i 320 nm. Čistoća DNK je procenjena na osnovu vrednosti količnika apsorbancija na 260 nm i 280 nm (260/280) i apsorbancija na 260/230 (260/230). Prihvatljivi opsezi/vrednosti su bili između 1,65 i 1,85 (260/280) odnosno $> 1,2$ (260/230). U suprotnom, ponavljana je izolacija DNK iz uzorka krvi. Vrednosti koncentracije izolovane DNK su bile od oko 20 ng/ μ l. Iz izolovane DNK uzimani su uzorci od 500 ng i dopunjavani vodom do zapremine od 125 μ l čime su dobijana razblaženja od 4 ng/ μ l koja su korišćena za određivanje polimorfizama. Ostatak DNK je čuvan na -20°C .

3.3.2. Detekcija i analiza polimorfizama gena reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) u realnom vremenu (*engl.* Real-time PCR)

Jedna od metoda za detekciju SNP-ova jeste i PCR u realnom vremenu sa primenom TaqMan eseja. PCR u realnom vremenu (kvantitativni PCR) predstavlja modifikaciju konvencionalnog PCR-a gde se dinamika amplifikacije meri u realnom vremenu nakon svakog PCR ciklusa. U PCR reakciji koriste se, pored prajmera, i alel specifične oligonukleotidne probe koje su na 5' kraju obeležene različitim fluorescentnim bojama (reporter boje npr. VIC, FAM) dok se na njihovom 3' kraju nalazi prigušivač (*engl.* quencher) koji blokira emisiju fluorescencije. Tokom PCR reakcije u fazi vezivanja prajmera po principu komplementarnosti se za ciljnu sekvencu DNK vezuje i jedna od proba. Nakon toga, u fazi kada Taq polimeraza dodaje nove nukleotide dolazi do uklanjanja probe 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću enzima. Kako se najpre odvaja 5' nukleotid sa reporterom, usled njegovog udaljavanja od prigušivača boja počinje da fluorescira, što se registruje pomoću odgovarajućeg detektora u aparatu. Iz ciklusa u ciklus raste intenzitet fluorescencije, što omogućava da se u realnom vremenu prati dinamika PCR reakcije. Na kraju PCR reakcije detektovano značajno povećanje

fluorescencije samo jedne od boja ukazuje na homozigotno stanje za dati alel, dok povećanje fluorescencije obe boje ukazuje na heterozigotno stanje.

Za detekciju i analizu polimorfizama gena *TNFA*, *IL6*, *IL10*, *IL12B*, *CYP3A5*, *IMPDH1* i *SLCO1B1* u genomu pacijenata sa transplantiranim bubregom primenjena je TaqMan metoda korišćenjem komercijalno dostupnih smeša oligonukleotida i to za *TNFA* rs1800629 (#C_514879_10), *IL6* rs1800795 (#C_1839697_20), *IL10* rs1800896 i rs1800871 (#C_1747360_10 i C_1747362_10), *IL12B* rs3212227 (#C_2084293_10), *CYP3A5* rs776746 (#C_26201809_30), *IMPDH1* rs2278294 (#C_2830834_20) i *SLCO1B1* rs2306283 i rs4149056 (#C_1901697_20 i C_30633906_10) (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD). Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je pomoću navedenih smeša komercijalnih oligonukleotida i Maxima™ Probe qPCR 2X Master Mix, (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) prema preporukama proizvođača reagenasa. Amplifikacija je vršena u optičkim pločama za PCR, formata 8 x 12 bunarčića (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), u koje su sipane reakcione smeše od 5 µl 2 x Real Master Mix Probe (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 0,25 µl komercijalne smeše oligonukleotida za detekciju navedenih polimorfizama i 4,75 µl ispitivanog DNK uzorka (4 ng/µl). Ploče su zatim zatvarane lepljenjem optičkog filma (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), kratko centrifugirane na 1500g i smeštane u termoblok Realplex2 PCR mašine (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka). Ploče su pre amplifikacije inkubirane u termobloku 4 minuta na 95°C da bi se aktivirala DNK polimeraza. Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sec → 60°C 1 minut sa 40 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 60°C. Po završetku amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

Za polimorfizam *IFNG* (-874 T/A; rs2430561), s obzirom da nisu postojali komercijalno dostupni oligonukleotidi, korišćena je smeša oligonukleotida koja je posebno dizajnirana uz optimizovanje uslova za amplifikaciju i razlikovanje alela po protokolu koji je prethodno opisan u Popadić D. i autori (600 nM F / 600 nM R / 250 nM A TaqMan proba / 400 nM T TaqMan proba, finalne koncentracije). Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sec → 55°C 1 minut → 68°C 20 sekundi sa 39 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 68° (153). Po završetku amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

U vreme kada je započeta ova studija, podaci o distribuciji alela i genotipova ispitivanih polimorfizama *IL10* i *IL6* gena kod zdravih kontrola nisu bili poznati. U međuvremenu, ti podaci su generisani u okviru druge studije koja je sprovedena u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju i korišćeni su za analizu u okviru ove doktorske disertacije (154). U odnosu na predviđene ciljeve, u ovoj doktorskoj disertaciji su dodatno ispitana dva polimorfizma u genima *IL12B* (rs3212227) i *CYP3A5* (rs776746).

3.4. Statistička analiza

Statistička analiza je urađena korišćenjem standardnih metoda deskriptivne statistike. Aritmetička sredina je korišćena kao mera centralne tendencije kod numeričkih obeležja a kao apsolutna mera disperzije skupa numeričkih podataka upotrebljena je standardna devijacija. Za utvrđivanje razlike u frekvenciji i distribuciji alela i genotipova različitih polimorfizama i kliničkih ishoda u ispitivanim grupama, primenjena je binarna logistička regresija. Za testiranje razlike između većeg broja grupa podataka, u zavisnosti od prisustva normalne raspodele, korišćena je jednofaktorska analiza varijanse ili Kruskal-Volisonov test odnosno za ponavljana višestruka merenja u različitim vremenskim intervalima korišćena je jednofaktorska analiza varijanse sa ponavljanim merenjima. U svim testovima vrednosti verovatnoće (p vrednosti) manje od 0,05 smatrane se statistički značajnim, a manje od 0,01 visoko statistički značajnim. Za statističku analizu podataka i pravljenje grafika su korišćeni IBM SPSS Statistics v.25 (IBM Corp., Armonk, NY, SAD) i GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, verzija 6, La Jolla, CA, SAD). U cilju određivanja haplotipova za *IL10* i *SLCO1B1* polimorfizme korišćen je algoritam maksimizacije očekivanja (*engl.* Estimation Maximization, EM) koji je implementiran unutar programskog paketa Arlequin v.3,5 (155).

4. Rezultati

4.1. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa transplantiranim bubregom

Ova studija je obuhvatila 152 odrasla bolesnika sa transplantiranim bubregom lečenih i ispitivanih na Klinici za nefrologiju KCS. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika prikazane su u tabeli 1. Distribucija muškog i ženskog pola bila je 60,5% i 39,5%, respektvno. Starost pacijenata u vreme kada je izvršena transplantacija izražena je u godinama, pri čemu je srednja vrednost iznosila 46,4 godina, uz opseg od 23 godina, što je bila minimalna vrednost, do maksimalne vrednosti od 73 godina. Osnovne bolesti koje su bile uzrok terminalnog oštećenja bubrega su razdvojene u 7 kategorija: glomerulonefritis (32,9%), hipertenzivna nefropatija (18,5%), dijabetesna nefropatija (3,3%), policistična bolest bubrega (17,1%), urođene anomalije bubrega (3,9%), druga oboljenja (11,8%) kao i nepoznati uzroci (12,5%). Bolesnici koji su uključeni u ovu studiju dobili su bubreg od živog davaoca u 59,2% slučajeva dok njih 40,8% su dobili organ od preminule nesrodne osobe. Svim bolesnicima je određen i HLA haplotip pri čemu je nepodudarnost u okviru HLA lokusa (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DR*) bila od 1 do 5 a srednja vrednost je bila 2,8. Akutno odbacivanje je registrovano kod 49 (32,2%) bolesnika dok 103 (67,8%) bolesnika nisu imala ovu komplikaciju. Odložena funkcija kalema se javila kod 41 bolesnika (27,0%) dok je bubreg uspostavio svoju normalnu funkciju neposredno nakon transplantacije kod 111 (73,0%) osoba. Svi ispitanici su primali kalcineurinske inhibitore kao deo kombinovane imunosupresivne terapije i to takrolimus 90 (59,2%) i ciklosporin 62 (40,8%) ispitanika. Nijedan od bolesnika nije bio visoko senzibilisan na antigene primaoca.

Tabela 1. Demografske i kliničke karakteristike 152 pacijenta sa transplantiranim bubregom.

Karakteristike 152 pacijenta sa transplantiranim bubregom	
Pol	
Muški	92 (60,5%)
Ženski	60 (39,5%)
Uzrast	46,4±11,8
Osnovna bolest zbog koje bubreg transplantiran	
Glomerulonefritis	50 (32,9%)
Hipertenzivna nefropatija	28 (18,5%)
Dijabetesna nefropatija	5 (3,3%)
Policistična bolest bubrega	26 (17,1%)
Anomalije bubrega	6 (3,9%)
Druga oboljenja	18 (11,8%)
Nepoznato	19 (12,5%)
Davalac	
Živ	90 (59,2%)
Preminuo	62 (40,8%)
HLA nepodudarnost (HLA-A,-B,-DR) *	2,8±0,9
Kalcineurinski inhibitor	
Ciklosporin	62 (40,8%)
Takrolimus	90 (59,2%)
Akutno odbacivanje	
Ne	103 (67,8%)
Da	49 (32,2%)
Odložena funkcija kalema	
Ne	111 (73,0%)
Da	41 (27,0%)

* srednja vrednost

4.2. Molekularno genetička analiza

Kod 152 bolesnika sa transplantiranim bubregom je određena distribucija alela i genotipova za polimorfizme *TNFA* rs1800629, *IL6* rs1800795, *IFNG* rs2430561, *IL10* rs1800896 i rs1800871, *IL12B* rs3212227, *CYP3A5* rs776746, *IMPDH1* rs2278294, i *SLCO1B1* rs2306283 i rs4149056, Frekvencije alela i genotipova polimorfizama *IL6* rs1800795, *IL10* rs1800896 i rs1800871 kod 250 zdravih osoba u populaciji Srbije su preuzete iz prethodno objavljene studije (154).

4.2.1. Ispitivanje polimorfizma *TNFA* gena (rs1800629) kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

Ispitivanje rs1800629 polimorfizma u promotoru gena za TNF kod bolesnika sa transplantiranim bubregom urađeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određeni za ispitanike u ovom istraživanju izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži, i to je prikazano u tabeli 2.

Tabela 2. Testiranje distribucije genotipova rs1800629 polimorfizma gena za TNF u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>TNFA</i> (rs1800629)		Bolesnici
	GG	112
Genotipovi	GA	38
	AA	2
Ukupno		152
HWE*		$\chi^2 = 0,38$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti, $p > 0,05$.

Dobijeni rezultati pokazuju da su distribucije genotipova rs1800629 polimorfizma gena za TNF bile u Hardy-Weinberg ravnoteži, $p > 0,05$.

Raspodela genotipova u populaciji bolesnika sa transplantiranim bubregom iz Srbije upoređena je sa podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija genotipova polimorfizma rs1800629 gena za TNF između bolesnika iz Srbije i bolesnika sa transplantiranim bubregom sa drugih geografskih područja. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. rs1800629 polimorfizam gena za TNF kod osoba sa transplantiranim bubregom u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	GG(%)	GA(%)	AA(%)	p
Perovic i sar.	Srbija	152	TaqMan	73,6	25,0	1,4	NP
(93)	Finska	291	PCR-SSP	70,1	28,2	1,7	0,722
(92)	Češka	436	PCR-RFLP	64,4	25,7	1,1	0,975
(156)	Venecuela	69	PCR-SSP	80,9	12,7	6,4	0,201
(157)	J. Koreja	164	PCR-SSP	88,0	12,0	0,0	0,002
(158)	Poljska	129	PCR-RFLP	67,4	30,2	2,4	0,477
(118)	Kanada	218	PCR-SSP	62,5	31,6	5,9	0,020
(159)	V.Britanija	209	PCR-RFLP	62,3	30,6	6,7	0,016

NP, nije primenjivo; PCR-RFLP, (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism), polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcijom digestijom; PCR-SSP, (*engl.* sequence specific primers), PCR koji diskriminuje alele upotrebom prajmera specifičnih za određenu DNK sekvencu.

Kao što je prikazano u tabeli 3, ustanovljena statistički značajna razlika u frekvencijama genotipova između populacije iz Srbije i populacija Južne Koreje, Kanade i Velike Britanije.

U sledećem koraku ispitana je povezanost rs1800629 polimorfizma gena za TNF u odnosu na pojavu akutnog odbacivanja odnosno odloženu funkciju kalema u okviru naše kohorte. Rezultati distribucije alela i genotipova, kao i statističke analize, prikazani su u tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Aleli i genotipovi rs1800629 polimorfizma gena za TNF stratifikovani u odnosu na akutno odbacivanje bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Akutno odbacivanje		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
TNFA (rs1800629)				
G [†]	177 (0,859)	85 (0,867)	-	-
A	29 (0,141)	13 (0,133)	0,841	0,93 (0,46-1,88)
GG [†]	75 (0,728)	37 (0,755)	-	-
GA	27 (0,262)	11 (0,224)	0,641	0,83 (0,37-1,84)
AA	1 (0,001)	1 (0,021)	0,621	2,03 (0,12-33,32)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; †referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Tabela 5. Aleli i genotipovi rs1800629 polimorfizma gena za TNF stratifikovani u odnosu na odloženu funkciju bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Odložena funkcija kalema		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
TNFA (rs1800629)				
G [†]	192 (0,865)	70 (0,854)	-	-
A	30 (0,135)	12 (0,146)	0,806	0,91 (0,44-1,88)
GG [†]	83 (0,748)	29 (0,707)	-	-
GA	26 (0,234)	12 (0,293)	0,497	1,32 (0,59-2,95)
AA	2 (0,018)	0 (0,000)	0,999	NP

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; †referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta; NP, nije primenjivo

Analizom distribucije alela i genotipova u odnosu na pojavu akutno odbacivanja odnosno odložene funkcije kalema kao ishoda utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika.

4.2.2. Ispitivanje polimorfizma *IL6* gena (rs1800795) kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

Komercijalni oligonukleotidi i TaqMan PCR metoda korišćeni su i za ispitivanje rs1800795 u promotornom regionu gena za IL-6. Distribucija alela i genotipova za *IL6* rs1800795 bila je u Hardy-Weinberg ekvilibrijumu, što je prikazano u tabeli 6.

Tabela 6. Testiranje distribucije genotipova rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IL6</i> (rs1800795)	Bolesnici	Kontrole
Genotipovi		
GG	53	87
GC	76	118
CC	23	45
Ukupno	152	250
HWE*	$X^2=0,25$	$X^2=0,20$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti, $p>0,05$.

Rezultati distribucije genotipova za *IL6* rs1800795 iz drugih studija upoređeni su sa rezultatima naše studije i prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. rs1800795 polimorfizam gena za IL-6 kod osoba sa transplantiranim bubregom u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	GG(%)	GC(%)	CC(%)	p
Perovic i sar.	Srbija	152	TaqMan	34,8	50,0	15,2	NP
(159)	V. Britanija	206*	PCR-RFLP	42,7	41,7	15,6	0,260
(93)	Finska	291	PCR-SSP	32,6	50,5	16,8	0,845
(160)	Poljska	125	PCR-SSP	31,2	43,2	21,6	0,295
(156)	Venecuela	63	PCR-SSP	65,1	30,2	4,7	0,001
(118)	Kanada	218	PCR-SSP	56,4	33,9	9,7	0,002
(161)	Italija	256	PCR-RFLP	51,6	37,5	10,9	0,004

*manji broj ispitanika u odnosu na polimorfizam gena za TNF; NP, nije primenjivo; PCR-RFLP, dužine fragmenata nastalih restrikcionom digestijom; PCR-SSP, PCR koji diskriminuje alele upotrebom prajmera specifičnih za određenu DNK sekvencu.

Kao što je prikazano u tabeli 7, utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između populacije bolesnika sa transplantiranim bubregom iz Srbije i populacija iz Venecuele, Kanade i Italije.

Dalja analiza povezanosti alela i genotipova rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 unutar naše kohorte nije pokazala statističku značajnost u odnosu na pojavu komplikacija kao što su akutno odbacivanje odnosno odložena funkcija kalema. Rezultati ovih analiza su prikazani u tabelama 8 i 9.

Tabela 8. Aleli i genotipovi rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 stratifikovani u odnosu na akutno odbacivanje bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Akutno odbacivanje		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
IL6 (rs1800795)				
G [†]	125 (0,607)	57 (0,582)	-	-
C	81 (0,393)	41 (0,418)	0,671	1,11 (0,68-1,81)
GG [†]	37 (0,359)	16 (0,327)	-	-
GC	51 (0,495)	25 (0,510)	0,745	1,13 (0,53-2,42)
CC	15 (0,146)	8 (0,163)	0,692	1,23 (0,44-3,49)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Tabela 9. Aleli i genotipovi rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 stratifikovani u odnosu na odloženu funkciju bubrega

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Odložena funkcija		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
IL6 (rs1800795)				
G [†]	132 (0,595)	50 (0,610)	-	-
C	90 (0,405)	32 (0,390)	0,806	0,94 (0,56-1,58)
GG [†]	39 (0,351)	14 (0,341)	-	-
GC	54 (0,486)	22 (0,537)	0,774	1,13 (0,52-2,49)
CC	18 (0,162)	5 (0,122)	0,666	0,77 (0,24-2,48)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

4.2.3. Ispitivanje polimorfizma *IFNG* gena (rs2430561) kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

Polimorfizam u prvom intronu gena za IFN-gama +874 (T/A) ispitan je pomoću oligonukleotidnih prajmera i proba dizajniranih Primer Express 2.0 programom kao što je prethodno opisano u literaturi (162). Dobijeni rezultati analizirani su i predstavljeni u tabeli 10.

Tabela 10. Testiranje distribucije genotipova rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IFNG (rs2430561)</i>		Bolesnici
	TT	42
Genotipovi	TA	70
	AA	40
Ukupno		152
HWE*		$\chi^2 = 0,94$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti, $p > 0,05$.

Analiza genotipova rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama pokazala je da ne postoji odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže.

Uporedna analiza distribucije genotipova rs2430561 polimorfizma između populacije ispitanika iz Srbije i drugih populacija u svetu pokazala je da postoji visoka statistička značajnost u odnosu na populaciju bolesnika sa transplantiranim bubregom iz Venecuele. Rezultati ove analize su prikazani na tabeli 11.

Tabela 11. rs2430561 polimorfizam gena za IFN-gama kod osoba sa transplantiranim bubregom u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	AA(%)	AT(%)	TT(%)	p
Perovic i sar.	Srbija	152	TaqMan	27,6	46,0	26,4	NP
(93)	Finska	291	PCR-SSP	39,5	43,3	17,2	0,156
(92)	Češka	436	PCR-RFLP	29,3	49,8	20,9	0,228
(156)	Venecuela	63	PCR-SSP	42,9	47,6	9,5	0,000
(118)	Kanada	218	PCR-SSP	31,2	49,5	19,3	0,156
(163)	Iran	84	PCR-SSP	29,8	33,3	36,9	0,146
(104)	Hrvatska	53	PCR-SSP	22,6	54,7	22,7	0,551

NP, nije primenjivo; PCR-RFLP, polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcijom digestijom; PCR-SSP, PCR koji diskriminše alele upotrebom prajmera specifičnih za određenu DNK sekvencu.

Analizirana je i distribucija učestalosti genotipova unutar grupe bolesnika sa transplantiranim bubregom u odnosu na pojavu akutnog odbacivanja bubrega odnosno odlžene funkcije kalema.

Tabela 12. Aleli i genotipovi rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama stratifikovani u odnosu na akutno odbacivanje bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Akutno odbacivanje		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>IFNG (rs2430561)</i>				
A [†]	99 (0,481)	51 (0,520)	-	-
T	107 (0,519)	47 (0,480)	0,517	0,85 (0,53-1,38)
AA [†]	24 (0,233)	16 (0,327)	-	-
AT	51 (0,495)	19 (0,388)	0,166	0,56 (0,24-1,27)
TT	28 (0,272)	14 (0,286)	0,531	0,75 (0,30-1,85)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Tabela 13. Aleli i genotipovi rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama stratifikovani u odnosu na odloženu funkcija bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Odložena funkcija		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>IFNG (rs2430561)</i>				
A [†]	113 (0,509)	37 (0,451)	-	-
T	109 (0,491)	45 (0,549)	0,371	1,26 (0,76-2,10)
AA [†]	29 (0,261)	11 (0,268)	-	-
AT	55 (0,495)	15 (0,366)	0,472	0,72 (0,29-1,77)
TT	27 (0,243)	15 (0,366)	0,425	1,46 (0,57-3,74)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Rezultati raspodele alela i genotipova rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama, stratifikovani u odnosu na akutno odbacivanje bubrega odnosno odloženu funkciju kalema, nisu ustanovili da postoji statistički značajna razlika kao što je i prikazano u tabelama 12 i 13.

4.2.4. Ispitivanje polimorfizama *IL10* gena (rs1800896, rs1800871 i rs1800872) kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

U okviru promotora gena za IL-10 ispitana su dva polimorfizma, *IL10* (rs1800896) i *IL10* (rs1800871) korišćenjem komercijalnih oligonukleotidnih proba TaqMan PCR metodom. Genotipovi za treći polimorfizam u okviru istog regiona gena *IL10* (1800872) izvedeni su iz SNP rs1800871 jer je ustanovljeno da su ova dva SNP u potpunoj neravnoteži vezanosti kod belaca (164). Ispitivanje je obuhvatilo populaciju bolesnika sa transplantiranim bubregom i populaciju zdravih kontrola.

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određivani za ispitanike u ovom istraživanju, izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži.

Tabela 14. Testiranje distribucije genotipova rs1800896 i rs1800871 polimorfizama gena za IL-10 u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IL10</i>	<i>rs1800896</i>			<i>rs1800871</i>		
		Bolesnici	Kontrole		Bolesnici	Kontrole
Genotipovi	AA	44	88	CC	81	136
	AG	78	118	CT	61	97
	GG	30	44	TT	10	17
Ukupno		152	250		152	250
HWE*		$X^2=0,19$	$X^2=0,31$		$X^2=0,11$	$X^2=0,00$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti, $p>0,05$.

Dobijeni rezultati pokazuju da su distribucije genotipova rs1800896 i rs1800871 polimorfizma gena za IL-10 u obe grupe bile u Hardy-Weinberg ravnoteži, $p>0,05$.

U sledećem koraku, upoređena je raspodela genotipova u populaciji bolesnika sa transplantiranim bubregom iz Srbije sa podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike u frekvenciji genotipova oba ispitivana polimorfizma gena za IL-10 između bolesnika iz Srbije i bolesnika iz drugih geografskih područja. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 15 i 16.

Tabela 15. rs1800896 polimorfizam gena za IL-10 kod osoba sa transplantiranim bubregom u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	AA(%)	GA(%)	GG(%)	p
Perovic i sar. (159)	Srbija	152	TaqMan	28,9	51,3	19,8	NP
(93)	V. Britanija	209	PCR-RFLP	21,0	42,6	36,4	0,002
(118)	Finska	291	PCR-SSP	31,0	46,0	23,0	0,549
(156)	Kanada	218	PCR-SSP	35,3	44,5	20,2	0,368
(163)	Venecuela	63	PCR-SSP	60,3	34,9	4,8	0,000
(165)	Iran	84	PCR-SSP	19,0	66,7	14,3	0,300
	Meksiko	64	PCR-SSP	42,2	51,6	6,3	0,023

NP, nije primenjivo; PCR-RFLP, polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcionom digestijom; PCR-SSP, PCR koji diskriminiše alele upotrebom prajmera specifičnih za određenu DNK sekvencu.

Tabela 16. rs1800871 polimorfizam gena za IL-10 kod osoba sa transplantiranim bubregom u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	CC(%)	CT(%)	TT(%)	p
Perovic i sar. (159)	Srbija	152	TaqMan	53,3	40,1	6,6	NP
(93)	V. Britanija	208*	PCR-RFLP	64,4	30,8	4,8	0,103
(156)	Finska	291	PCR-SSP	61,2	34,0	4,8	0,263
(118)	Venecuela	63	PCR-SSP	46,0	42,9	11,1	0,427
(165)	Kanada	218	PCR-SSP	43,2	41,7	15,1	0,022
	Meksiko	64	PCR-SSP	48,4	28,1	23,4	0,001

*manji broj ispitanika u odnosu na polimorfizam gena za TNF; NP, nije primenjivo; PCR-RFLP, polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcionom digestijom; PCR-SSP, PCR koji diskriminše alele upotrebom prajmera specifičnih za određenu DNK sekvencu.

Kao što je prikazano u priloženim tabelama, frekvencija genotipova rs1800896 polimorfizma bolesnika u Srbiji značajno se razlikuje u odnosu na populacije Velike Britanije, Venecuele i Meksika. Slično, utvrđeno je postojanje statističke značajnosti u distribuciji genotipova rs1800871 polimorfizma između kohorti ispitanika u Srbiji i ispitanika u Kanadi i Meksiku.

Rezultati distribucije alela i genotipova u odnosu na pojavu akutnog odbacivanja odnosno odložene funkcije kalema za sva tri ispitivana polimorfizma u okviru *IL10* gena kod bolesnika sa transplantiranim bubregom prikazani su u tabelama 17 i 18.

Tabela 17. Aleli i genotipovi rs1800896, rs1800871 i rs1800872 polimorfizama gena za IL-10 stratifikovani u odnosu na akutno odbacivanje bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Akutno odbacivanje		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>IL10 (rs1800896)</i>				
A [†]	113 (0,549)	53 (0,541)	-	-
G	93 (0,451)	45 (0,459)	0,887	1,03 (0,64-1,67)
AA [†]	30 (0,291)	14 (0,286)	-	-
AG	53 (0,515)	25 (0,510)	0,979	1,01 (0,46-2,23)
GG	20 (0,194)	10 (0,204)	0,891	1,07 (0,40-2,88)
<i>IL10 (rs1800871)</i>				
C [†]	152 (0,738)	71 (0,724)	-	-
T	54 (0,262)	27 (0,276)	0,806	1,07 (0,62-1,84)
CC [†]	55 (0,534)	26 (0,531)	-	-
CT	42 (0,408)	19 (0,388)	0,617	1,41 (0,37-5,43)
TT	6 (0,058)	4 (0,082)	0,904	0,96 (0,47-1,97)
<i>IL10 (rs1800872)</i>				
C [†]	152 (0,738)	71 (0,724)	-	-
A	54 (0,262)	27 (0,276)	0,806	1,07 (0,62-1,84)
CC [†]	55 (0,534)	26 (0,531)	-	-
CA	42 (0,408)	19 (0,388)	0,617	1,41 (0,37-5,43)
AA	6 (0,058)	4 (0,082)	0,904	0,96 (0,47-1,97)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; †referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Tabela 18. Aleli i genotipovi rs1800896, rs1800871 i rs1800872 polimorfizama gena za IL-10 stratifikovani u odnosu na odloženu funkciju kalema.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Odložena funkcija		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>IL10 (rs1800896)</i>				
A [†]	124 (0,559)	42 (0,512)	-	-
G	98 (0,441)	40 (0,488)	0,471	1,20 (0,72-2,00)
AA [†]	33 (0,297)	11 (0,268)	-	-
AG	58 (0,523)	20 (0,488)	0,938	1,03 (0,44-2,42)
GG	20 (0,180)	10 (0,244)	0,436	1,50 (0,54-4,16)
<i>IL10 (rs1800871)</i>				
C [†]	163 (0,734)	60 (0,732)	-	-
T	59 (0,266)	22 (0,268)	1,000	1,01 (0,57-1,79)
CC [†]	60 (0,541)	21 (0,512)	-	-
CT	43 (0,387)	18 (0,439)	0,636	1,20 (0,57 -2,51)
TT	8 (0,072)	2 (0,049)	0,685	0,71 (0,14-3,64)
<i>IL10 (rs1800872)</i>				
C [†]	163 (0,734)	60 (0,732)	-	-
A	59 (0,266)	22 (0,268)	1,000	1,01 (0,57-1,79)
CC [†]	60 (0,541)	21 (0,512)	-	-
CA	43 (0,387)	18 (0,439)	0,636	1,20 (0,57-2,51)
AA	8 (0,072)	2 (0,049)	0,685	0,71 (0,14-3,64)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Analizom rezultata može se zaključiti da nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova za ispitivane *IL10* polimorfizme između bolesnika sa i bez akutnog odbacivanja bubrega odnosno sa i bez odložene funkcije transplantiranog bubrega.

U cilju određivanja haplotipova za *IL10* polimorfizme korišćen je algoritam maksimizacije očekivanja (*engl.* Estimation Maximization, EM) koji je implementiran unutar programskog paketa Arlequin v. 3,5 (155). Dobijena su tri haplotipa GCC, ACC, ATA u grupi zdravih kontrola a kod bolesnika sa transplantiranim bubregom identifikovan je i četvrti GTA haplotip koji je inače veoma redak haplotip u populaciji belaca (tabela 19).

Tabela 19. Distribucija *IL10* haplotipova u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom i zdravih kontrola.

<i>IL10</i> haplotip	Kontrole	Bolesnici	p*
GCC	205 (0,410)	135 (0,444)	
ACC	165 (0,330)	88 (0,289)	
ATA	130 (0,260)	78 (0,257)	
GTA	0 (0,000)	3 (0,099)	0,09

*p vrednost je dobijena na osnovu Pirsonovog χ^2 testa.

Kao što je prikazano u tabeli 19, ni ovde nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvencijama *IL10* haplotipova između zdravih kontrola i grupe bolesnika sa transplantiranim bubregom.

U sledećoj analizi, povezanost *IL10* haplotipova je ispitana u odnosu na pojavu akutnog odbacivanja i odložene funkcije kalema kao što je i prikazano u tabelama 20 i 21.

Tabela 20. Distribucija *IL10* haplotipova u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom stratifikovana u odnosu na akutno odbacivanje bubrega.

<i>IL10</i> haplotip	Akutno odbacivanje		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
GCA [†]	91 (0,441)	44 (0,450)	-	-
ACC	61 (0,296)	27 (0,275)	0,764	0,91 (0,51-1,63)
ATA	52 (0,252)	26 (0,265)	0,920	1,04 (0,56-1,92)
GTA	2 (0,010)	1 (0,010)	0,930	0,89 0,08-10,53)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Tabela 21. Distribucija *IL10* haplotipova u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom stratifikovana u odnosu na odloženu funkciju kalema.

<i>IL10</i> haplotip	Odložena funkcija		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
GCA [†]	95 (0,428)	40 (0,488)	-	-
ACC	68 (0,306)	20 (0,244)	0,236	0,68 (0,37 – 1,27)
ATA	56 (0,252)	22 (0,268)	0,823	0,93 (0,49 – 1,76)
GTA	3 (0,014)	0 (0,000)	1,000	NP

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta; NP, nije primenjivo.

Poređenjem distribucije *IL10* haplotipova između grupa ispitanika sa i bez navedenih ranih komplikacija nije detektovana statistički značajna razlika.

4.2.5. Ispitivanje polimorfizma *IL12B* gena (rs 3212227) kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

U našoj seriji ispitanika određena je i distribucija genotipova polimorfizma *IL12B* gena (rs 3212227). Prvobitni ciljevi ove doktorske teze su prošireni za pomenuti polimorfizam kako bi se ispitivanje učinilo sveobuhvatnijim. Rezultat genotipizacije i usklađenosti sa Hardy-Weinberg ravnotežom prikazan je na tabeli 22.

Tabela 22. Testiranje distribucije genotipova rs3212227 polimorfizma gena *IL12B* u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IL12B</i> (rs 3212227)	Bolesnici
AA	105
Genotipovi AC	43
CC	4
Ukupno	152
HWE*	$\chi^2 = 0,01$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti, $p > 0,05$.

Dobijeni rezultati pokazuju da su distribucije genotipova rs3212227 polimorfizma gena za IL-12/23 bile u Hardy-Weinberg ravnoteži, $p > 0,05$.

Podaci iz naše populacije poređeni su sa trenutno dostupnim podacima iz sveta i uočena je statistički značajna razlika u odnosu na distribuciju genotipova ispitivanog polimorfizma *IL12B* u populaciji iz Francuske odnosno visoko statistički značajna razlika u odnosu na populaciju bolesnika sa transplantiranim bubregom u Kanadi (Tabela 23).

Tabela 23. rs3212227 polimorfizam gena *IL12B* kod osoba sa transplantiranim bubregom u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	AA(%)	AC (%)	CC(%)	p
Perovic i sar. (118)	Srbija	152	TaqMan	69,1	28,3	2,6	NP
(119)	Kanada	218	PCR-SSP	53,7	34,4	11,9	0,000
	Francuska	253	PCR-RFLP	55,7	39,5	4,8	0,026

NP, nije primenjivo; PCR-RFLP, polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcijom digestijom; PCR-SSP, PCR koji diskriminiše alele upotrebom prajmera specifičnih za određenu DNK sekvencu.

Kao i u prethodnim analizama izvršeno je poređenje distribucije genotipova i alela nakon stratifikacije kohorte u odnosu na akutno odbacivanje odnosno odloženu funkciju kalema kao što je prikazano u tabelama 24 i 25.

Tabela 24. Aleli i genotipovi rs3212227 polimorfizma gena *IL12B* stratifikovani u odnosu na akutno odbacivanje bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Akutno odbacivanje		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>IL12B (rs 3212227)</i>				
A [†]	170 (0.825)	83 (0.847)	-	-
C	36 (0.175)	15 (0.153)	0,639	0,85 (0,44-1,65)
AA [†]	71 (0.689)	34 (0.694)	-	-
AC	28 (0.273)	15 (0.306)	0,764	1,12 (0,53-2,36)
CC	4 (0.038)	0 (0.000)	0,307	NP

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta; NP, nije primenjivo.

Tabela 25. Aleli i genotipovi rs3212227 polimorfizma gena *IL12B* stratifikovani u odnosu na odloženu funkcija bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Odložena funkcija		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>IL12B (rs 3212227)</i>				
A [†]	190 (0,856)	63 (0,768)	-	-
C	32 (0,144)	19 (0,232)	0,070	1,79 (0,95-3,38)
AA [†]	82 (0,739)	23 (0,561)	-	-
AC	26 (0,234)	17 (0,415)	0,028	2,33 (1,08-5,01)
CC	3 (0,027)	1 (0,024)	1,000	1,18 (0,11-11,97)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Nakon analize povezanosti alela i genotipova rs3212227 polimorfizma gena *IL12B* utvrđena je povezanost između AC genotipa i povećanog rizika od pojave odložene funkcije kalema (p=0,028) uz izračunat odnos šansi (OŠ) 2,33 u okviru intervala poverenja 95% (95%IP) od 1,08 do 5,01. Ovaj nalaz sugerije da se genotip AA može označiti kao potencijalno protektivan u odnosu na pojavu gorenavedene rane komplikacije nakon transplantacije bubrega (OŠ je 0,43 u 95%IP od 0,20 do 0,92). Nasuprot tome, nije uočena povezanost ovog polimorfizma sa akutnim odbacivanjem bubrega.

4.2.6. Ispitivanje polimorfizama gena za proteine koji utiču na terapijsku efikasnost imunosupresivnih lekova

U ovu studiju uključeno 152 bolesnika sa transplantiranim bubregom koji u pogledu primenjene imunosupresivne terapije predstavljaju heterogenu grupu. U cilju ispitivanja povezanosti između pojave komplikacija nakon izvršene transplantacije i polimorfizama gena koji kodiraju proteine za metabolizam i transport lekova bilo je neophodno da se izaberu oni ispitanici koji su isključivo primali takrolimus, preparate mikofenolične kiseline i prednizolon. Ovim je broj ispitanika značajno smanjen (84 bolesnika) ali je zato postignuta značajno bolja homogenost unutar grupe.

4.2.7. Ispitivanje polimorfizma *IMPDH1* gena (rs2278294) kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

IMPDH1 je gen koji kodira inozin 5'-monofostat dehidrogenazu 1, enzim koji je važan za metabolizam mikofenolične kiseline. Ispitivanje polimorfizama rs2278294 ovog gena urađeno je korišćenjem komercijalnih oligonukleotidnih proba TaqMan PCR metodom. Distribucija genotipova rs2278294 polimorfizma gena za *IMPDH1* predstavljena je na tabeli 26.

Tabela 26. Testiranje distribucije genotipova rs2278294 polimorfizma gena za *IMPDH1* u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IMPDH1</i> (rs2278294)	Bolesnici
Genotipovi	
GG	37
GA	29
AA	18
Ukupno	84
HWE*	$X^2= 6,23$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti, $p < 0,05$.

Testiranje distribucije genotipova rs2278294 polimorfizma gena za *IMPDH1* korišćenjem Pearsonovog X^2 -testa pokazalo je postoji statistički značajno odstupanje u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu ($p < 0,05$). Ovo se može objasniti činjenicom da je uzorak od 84 ispitanika posebno odabran iz veće grupe od 152 ispitanika gde ovo odstupanje nije detektovano.

Dalje, podaci iz naše populacije poređeni su sa podacima iz sveta i nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na distribuciju genotipova ispitivanog polimorfizma. Rezultati ove analize prikazani su na tabeli 27.

Tabela 27. rs2278294 gena *IMPDH1* kod osoba sa transplantiranim bubregom u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	GG(%)	GA (%)	AA(%)	p
Perovic i sar. (149)	Srbija	84	TaqMan	44,0	34,5	21,4	NP
(166)	Francuska	456	TaqMan	41,2	45,6	13,2	0,151
	Japan	82	PCR-RFLP	30,5	48,8	20,7	0,130

NP, nije primenjivo; PCR-RFLP, polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcijom digestijom; PCR-SSP, PCR koji diskriminiše alele upotrebom prajmera specifičnih za određenu DNK sekvencu.

U ovoj studiji ispitana je i moguća povezanost između učestalosti alela i genotipova polimorfizma rs2278294 i akutnog odbacivanja odnosno odložene funkcije kalema.

Tabela 28. Aleli i genotipovi rs2278294 polimorfizma gena za *IMPDH1* stratifikovani u odnosu na akutno odbacivanje bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Akutno odbacivanje		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>IMPDH1</i> (rs2278294)				
G [†]	60 (0,577)	43 (0,672)	-	-
A	44 (0,423)	21 (0,328)	0,219	0,67 (0,35-1,28)
GG [†]	20 (0,385)	17 (0,531)	-	-
GA	20 (0,385)	9 (0,281)	0,221	0,53 (0,19-1,47)
AA	12 (0,231)	6 (0,188)	0,376	0,59 (0,18-1,90)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta

Tabela 29. Aleli i genotipovi rs2278294 polimorfizma gena za IMPDH1 stratifikovani u odnosu na odloženu funkciju bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Odložena funkcija kalema		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>IMPDH1</i> (rs2278294)				
G [†]	63 (0,656)	33 (0,569)	-	-
A	33 (0,344)	25 (0,431)	0,806	0,91 (0,44-1,88)
GG [†]	26 (0,542)	11 (0,379)	-	-
GA	11 (0,229)	11 (0,379)	0,484	1,44 (0,51-4,04)
AA	11 (0,229)	7 (0,241)	0,498	1,50 (0,46-4,90)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Kao što je prikazano na tabelama 28 i 29, nije uočena povezanost između ovog polimorfizma i navedenih komplikacija.

4.2.8. Ispitivanje polimorfizama *SLCO1B1* gena (rs2306283 i rs4149056) kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

U ovoj studiji određena je distribucija genotipova dva funkcionalna polimorfizma (rs2306283 i rs4149056) *SLCO1B1* gena koji kodira protein na membrani hepatocita i koji je uključen u transport velikog broja lekova. Rezultat genotipizacije i testiranje u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežom prikazan je na tabeli 30.

Tabela 30. Testiranje distribucije genotipova rs4149056 i rs2306283 polimorfizama *SLCO1B1* gena u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>SLCO1B1</i>	<i>rs2306283</i>	<i>rs4149056</i>		
	AA	28	TT	53
Genotipovi	AG	39	TC	27
	GG	17	CC	4
Ukupno		84		84
HWE*		X ² =0,05		X ² =0,26

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti, $p > 0,05$.

Analiza je pokazala da ne postoji odstupanje distribucije genotipova u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

Iz literature su sakupljeni podaci o distribuciji genotipova rs2306283 i rs4149056 polimorfizama gena *SLCO1B1* u različitim populacijama bolesnika sa transplantranim bubregom u svetu i poređeni sa distribucijom genotipova ispitanika u Srbiji.

Tabela 31. rs2306283 polimorfizam gena *SLCO1B1* kod osoba sa transplantiranim bubregom u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	AA(%)	GA(%)	GG(%)	p
Perovic i sar.	Srbija	84	TaqMan	33,3	46,4	20,3	NP
(167)	Holandija	325	TaqMan	31,4	45,2	23,4	0,823
(168)	Brazil	127	TaqMan	26,0	41,7	32,3	0,613

NP, nije primenjivo; PCR-RFLP, polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcionom digestijom; PCR-SSP, PCR koji diskriminiše alele upotrebom prajmera specifičnih za određenu DNK sekvencu

Tabela 32 rs4149056 polimorfizam gena *SLCO1B1* kod osoba sa transplantiranim bubregom u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	TT(%)	TC(%)	CC(%)	p
Perovic i sar.	Srbija	84	TaqMan	63,1	32,1	4,8	NP
(167)	Holandija	336	TaqMan	69,6	27,1	3,3	0,484
(168)	Brazil	128	TaqMan	75,0	21,9	3,1	0,179

NP, nije primenjivo; PCR-RFLP, polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcijom digestijom; PCR-SSP, PCR koji diskriminiše alele upotrebom prajmera specifičnih za određenu DNK sekvencu.

Kao što je prikazano u tabelama 31 i 32, nema statistički značajne razlike između poređenih grupa.

U sledećem koraku poredili smo distribucije alela i genotipova oba polimorfizma *SLCO1B1* gena unutar grupe bolesnika sa transplantiranim bubregom koji su prethodno bili stratifikovani u odnosu na pojavu akutnog odbacivanja bubrega odnosno odloženu funkciju kalema. Podaci su prikazani na tabelama 33 i 34.

Tabela 33. Aleli i genotipovi rs2306283 i rs4149056 polimorfizama *SLCO1B1* gena stratifikovani u odnosu na akutno odbacivanje bubrega.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Akutno odbacivanje		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>SLCO1B1</i> (rs2306283)				
A [†]	57 (0,548)	38 (0,594)	-	-
G	47 (0,452)	26 (0,406)	0,560	0,83 (0,44-1,56)
AA [†]	16 (0,308)	12 (0,375)	-	-
GA	25 (0,481)	14 (0,438)	0,565	0,75 (0,28-2,02)
GG	11 (0,212)	6 (0,188)	0,616	0,73 (0,21-2,52)
<i>SLCO1B1</i> (rs4149056)				
T [†]	80 (0,769)	53 (0,824)	-	-
C	24 (0,231)	11 (0,172)	0,362	0,69 (0,31-1,53)
TT [†]	31 (0,596)	22 (0,688)	-	-
TC	18 (0,346)	9 (0,281)	0,479	0,70 (0,27-1,86)
CC	3 (0,058)	1 (0,031)	0,525	0,47 (0,05-4,82)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Tabela 34. Aleli i genotipovi rs2306283 i rs4149056 polimorfizama *SLC01B1* gena stratifikovani u odnosu na odloženu funkciju kalema.

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Odložena funkcija		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
<i>SLC01B1</i> (rs2306283)				
A [†]	60 (0,545)	35 (0,603)	-	-
G	50 (0,455)	23 (0,397)	0,471	1,27 (0,66-2,42)
AA [†]	18 (0,327)	10 (0,345)	-	-
GA	24 (0,436)	15 (0,517)	0,819	1,12 (0,41-3,08)
GG	13 (0,236)	4 (0,138)	0,395	0,55 (0,14-2,16)
<i>SLC01B1</i> (rs4149056)				
T [†]	88 (0,800)	45 (0,776)	-	-
C	22 (0,200)	13 (0,224)	0,718	1,15 (0,53-2,50)
TT [†]	36 (0,655)	17 (0,586)	-	-
TC	16 (0,291)	11 (0,379)	0,770	0,71 (0,07-7,29)
CC	3 (0,055)	1 (0,034)	0,443	1,46 (0,56-3,80)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Kao što se može videti iz priloženog, nije nađena značajna udruženost ovih polimorfizama sa pojavom akutnog odbacivanja bubrega odnosno odložene funkcije kalema.

Slično, kao i prilikom određivanja haplotipova za *IL10* polimorfizme, za određivanje *SLC01B1* haplotipova primenjen je algoritam maksimizacije očekivanja korišćenjem programskog paketa Arlequin v. 3,5. Dobijena su četiri haplotipa *1B (388G-521T), *1A (388A-521T), *15 (388G-521C) i * 5 (388A-521C) što je i prikazano na tabeli 35.

Tabela 35. Distribucija *SLC01B1* haplotipova u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom.

SLC01B1 haplotip	Pacijenti
*1B (388G-521T)	46 (0,273)
*1A (388A-521T)	87 (0,518)
*15 (388G-521C)	27 (0,161)
*5 (388A-521C)	8 (0,048)

U daljem ispitivanju, analizirali smo da li postoji razlika u distribuciji *SLC01B1* haplotipova unutar grupe bolesnika sa transplantiranim bubregom u odnosu na pojavu akutnog odbacivanja bubregu odnosno odloženu funkciju kalema.

Tabela 36. Distribucija *SLC01B1* haplotipova u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom stratifikovana u odnosu na akutno odbacivanje bubrega.

<i>SLC01B1</i> haplotip	Akutno odbacivanje		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
*1B (388G-521T)†	29 (0,279)	17 (0,265)	-	-
*1A (388A-521T)	51 (0,490)	36 (0,562)	0,617	1,20 (0,58-2,51)
*15 (388G-521C)	18 (0,173)	9 (0,141)	0,752	0,86 (0,31-2,32)
*5 (388A-521C)	6 (0,058)	2 (0,031)	0,697	0,57 (0,10-3,14)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; †referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Tabela 37. Distribucija *SLC01B1* haplotipova u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom stratifikovana u odnosu na odloženu funkciju kalema.

<i>SLC01B1</i> haplotip	Odložena funkcija		p*	OŠ (95%IP)
	Ne	Da		
*1B (388G-521T) [†]	34 (0.315)	12 (0.214)	-	-
*1A (388A-521T)	54 (0.500)	31 (0.554)	0,227	1,63 (0,74-3,59)
*15 (388G-521C)	14 (0.130)	11 (0.196)	0,123	2,23 (0,80-6,22)
*5 (388A-521C)	6 (0.055)	2 (0.036)	1,000	0,94 (0,17-5,33)

*p vrednost je dobijena na osnovu binarne logističke regresije; [†]referentni alel ili genotip; OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja; frekvencije alela i genotipova su zaokružene na tri decimalna mesta.

Na osnovu podataka prikazanih u tabelama 36 i 37, nije utvrđena povezanost između *SLC01B1* haplotipova i pojave akutnog odbacivanja bubrega odnosno odložene funkcije kalema.

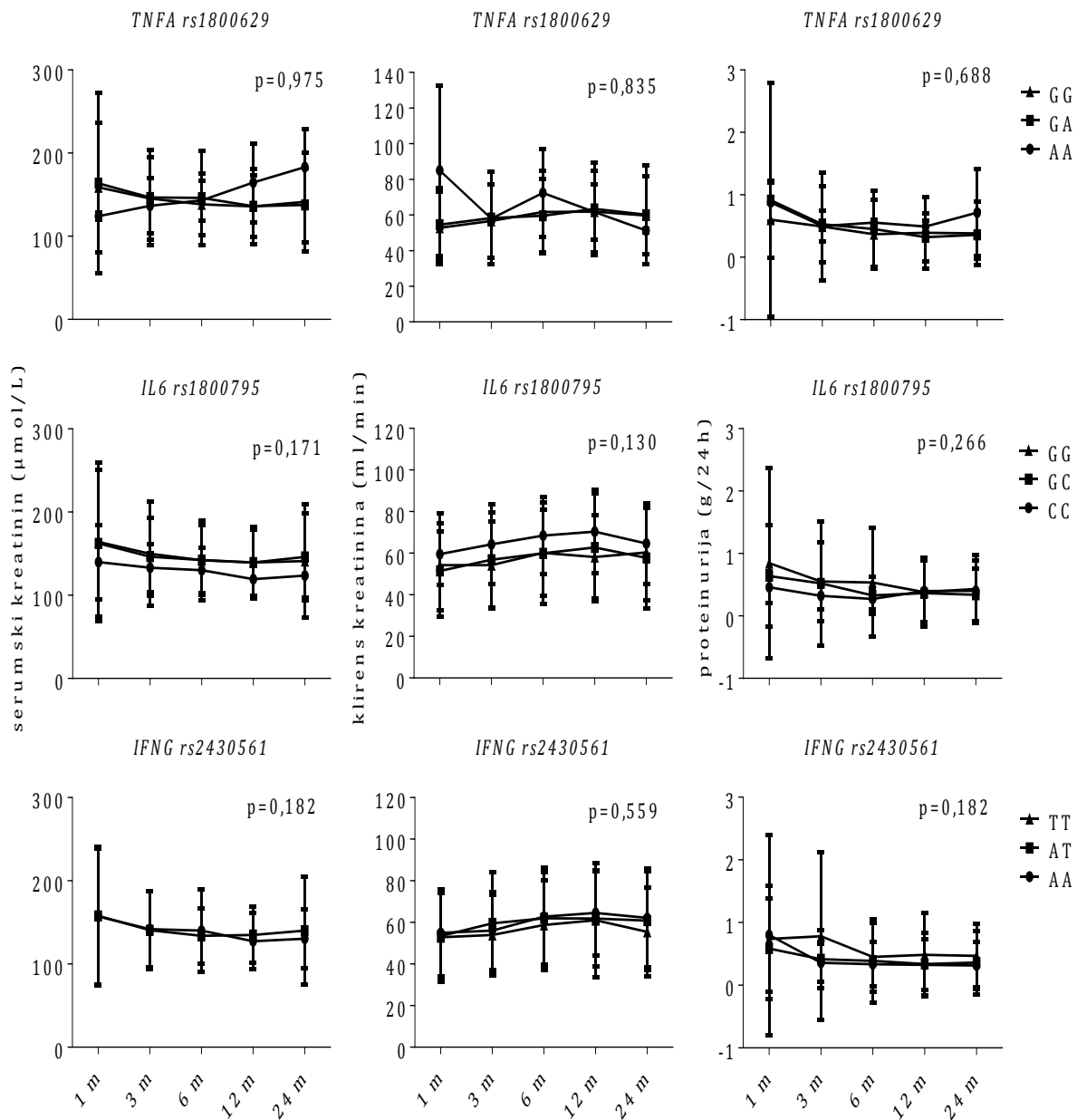
4.2.1. Ispitivanje polimorfizma *CYP3A5* gena (rs776746) kod bolesnika sa transplantiranim bubregom

Ispitivanje polimorfizma gena *CYP3A5* (rs776746) pokazalo je da ovaj lokus nije polimorfan u našoj kohorti jer su svi ispitanici bili homozigoti za G alel. Daljim ispitivanjem u grupi od 100 zdravih kontrola ustanovljeno je da postoji samo jedna osoba koja je nosilac A alela što ukazuje da je frekvencija ovog alela u našoj populaciji ispod 1%. Ovaj polimorfizam nije razmatran u daljoj analizi.

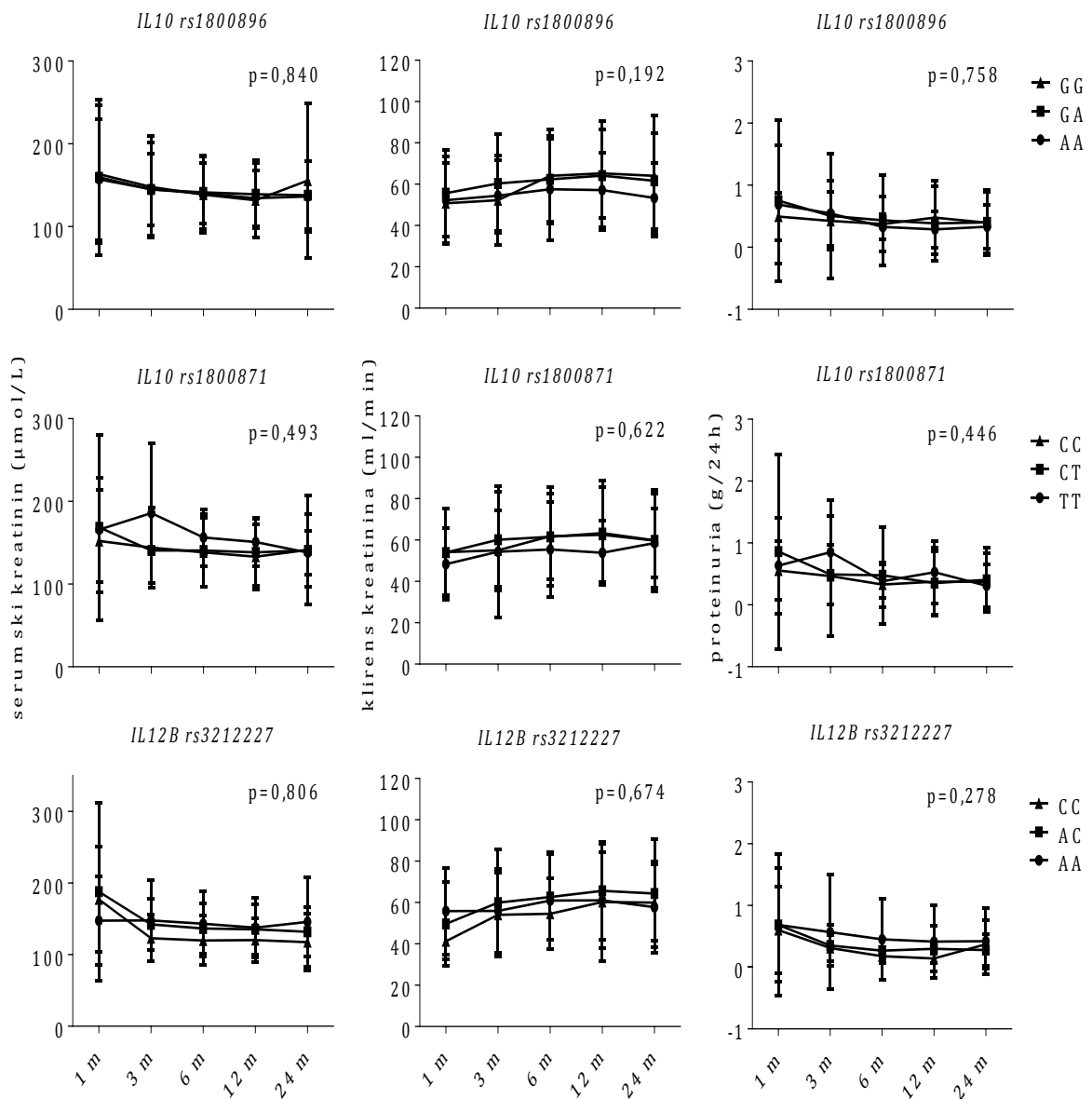
4.3. Ispitivanje povezanosti polimorfizama gena za citokine i vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije kod bolesnika nakon transplatacije bubrega

U ovoj studiji sprovedeno je ispitivanje povezanosti polimorfizama gena za citokine i vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije kod bolesnika nakon transplantacije bubrega.

Jednofaktorskom analizom varijanse sa ponavljanim merenjima upoređene su vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije merene u različitim vremenskim tačkama (1 mesec, 3 meseca, 6 meseci, 12 meseci i 24 meseca) između odgovarajućih genotipova gena za citokine. Na slikama 2 i 3 prikazane su srednje vrednosti i standardna devijacija za svaki genotip u različitim vremenskim tačkama.



Slika 2. Poređenje vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije između odgovarajućih genotipova gena za TNF, IL-6 i IFN-gama



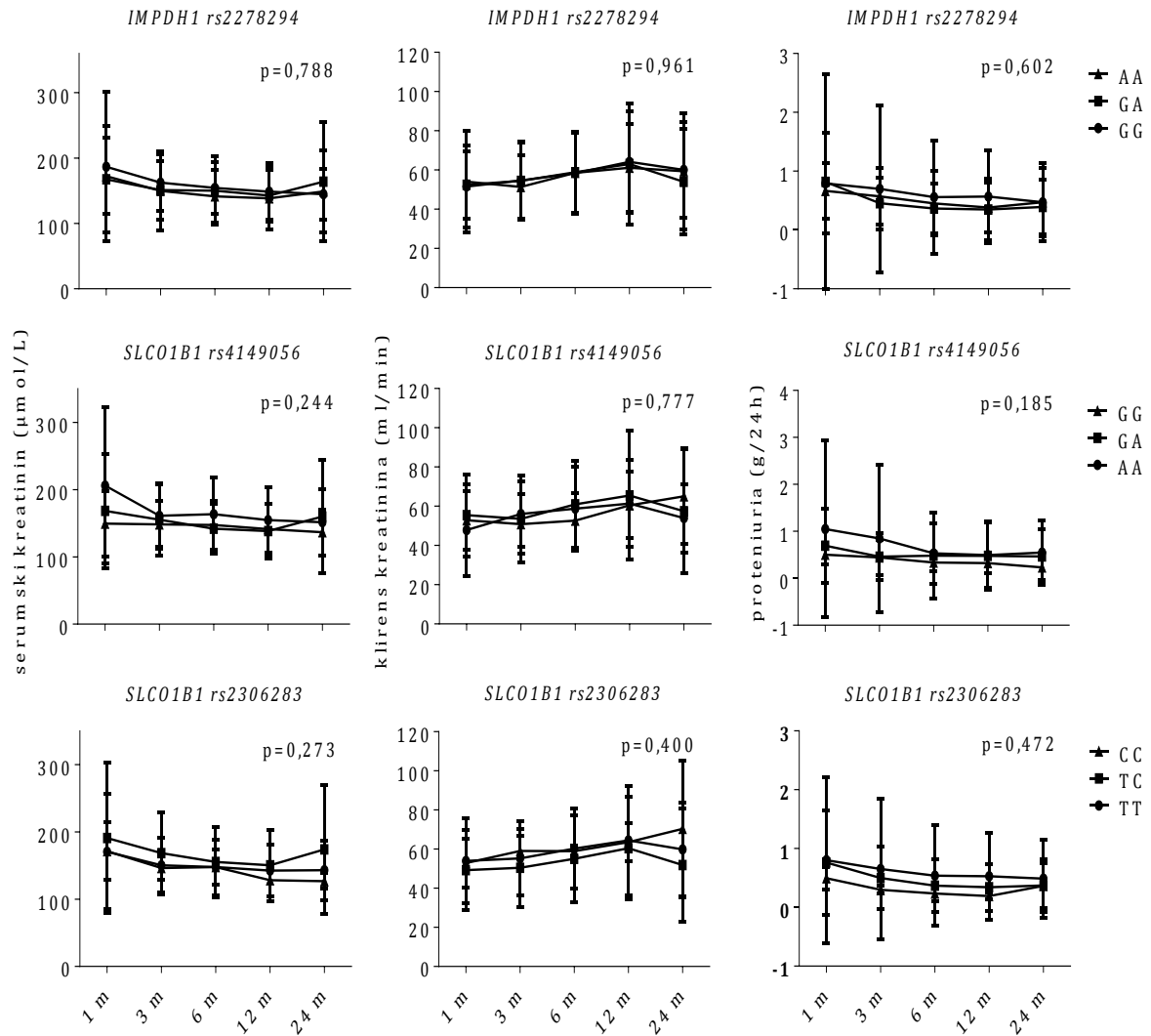
Slika 3. Poređenje vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije između odgovarajućih genotipova gena za IL-10 i IL-12p40

Kao što se vidi iz priloženog, nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između genotipova gena za TNF, IL-6, IFN-gama, IL-10 i subjedinicu IL12p40 u vrednostima kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije.

4.4. Ispitivanje povezanosti polimorfizama gena za proteine koji metabolišu i transportuju lekove i vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije kod bolesnika nakon transplatacije bubrega

U ovoj studiji ispitana je povezanost polimorfizama gena za proteine koji metabolišu i transportuju lekove i vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije kod bolesnika nakon transplantacije bubrega.

Jednofaktorskom analizom varijanse sa ponavljanim merenjima upoređene su vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije merene u različitim vremenskim tačkama (1 mesec, 3 meseca, 6 meseci, 12 meseci i 24 meseca) između odgovarajućih genotipova gena za proteine koji metabolišu i transportuju lekove. Na slici 4 prikazane su srednje vrednosti i standardna devijacija za svaki genotip u različitim vremenskim tačkama.



Slika 4. Poređenje vrednosti serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije između odgovarajućih genotipova *IMPDH1* i *SLC01B1* gena

Korelacijom genotipova rs2306283 i rs4149056 polimorfizama sa vrednostima serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije kod bolesnika sa transplantiranim bubregom nije dobijena statistički značajna razlika u rezultatima.

5. Diskusija

U poslednje dve decenije, napredak u transplantacionoj medicini je omogućio da se prevaziđu mnogi klinički izazovi prilikom presađivanja bubrega. Prvenstveno, značajno su smanjeni učestalost AO, zatim toksičnost povezana sa primenom imunosupresivnih lekova kao i mortalitet nastao usled infekcije. Do sada je identifikovan veliki broj faktora koji utiču na ishod transplantacije bubrega od kojih treba posebno istaći podudarnost u okviru HLA lokusa, postojanje antitela protiv antigena kalema kod primaoca, demografske faktore (uzrast i etnička pripadnost), vrstu imunosupresivne terapije kao i faktore koji su usko povezani sa komplikacijama nastalim tokom hiruške intervencije. Iako svi ti faktori mogu da dovedu do komplikacija nakon transplantacije bubrega, uključujući i DGF i AO, još uvek, nažalost, ne postoje definisani načini i postupci kojim bi se oni jasno identifikovali i njihov uticaj predvideo. Stoga, postoji velika potreba da se identifikuju biomarkeri koji bi to omogućili i na taj način smanjili učestalost ovih komplikacija i olakšali njihovu dijagnozu i terapiju. U tom smislu, ispitivanje genetičkih biomarkera relevantnih za patogenezu AO i DGF i njihovo uvođenje u kliničku praksu daje veliku nadu za unapređenje lečenja bolesnika sa transplantiranim bubregom. Ova studija je ispitala mogućnost da se polimorfizmi u genima koji kodiraju različite citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport imunosupresivnih lekova koriste kao biomarkeri akutnog odbacivanja i/ili odložene funkcije transplantiranog bubrega i ukazala na ulogu polimorfizma rs3212227 (+1188A/C) u *IL12B* genu u razvoju DGF i njegovu potencijalnu kliničku primenu u predikciji ove rane komplikacije nakon transplantaciji bubrega.

U ovo istraživanje su uključena 152 bolesnika sa transplantiranim bubregom koji su u periodu od 2012. do 2014. godine dolazili na redovnu kontrolu u Kliniku za nefrologiju Kliničkog centra Srbije. Osnovni inkluzioni kriterijum je bio da bolesnici primaju standardnu imunosupresivnu terapiju koja uključuje tri leka: jedan od kalcineurinskih inhibitora (ciklosporin ili takrolimus), preparate MFK, kao i kortikosteroide (prednizolon).

Jedan od najvećih izazova prilikom dizajniranja ovakvih studija predstavlja zadatak da se grupa ispitanika učini što homogenijom po pitanju primenjene terapije kao i demografskih faktora čime bi se izbegli njihovi uticaji na rezultate ispitivanja. Uprkos relativno dugom periodu za odabir bolesnika, ova studija je pokazala značajnu heterogenost kada je u pitanju uzrast ispitanika (23-73 godine), broj nepodudaranja u okviru HLA lokusa (0-5), vrsta transplantacije (organ dobijen od živog davaoca 59,8%

naspram 40,2% gde je organ dobijen od preminule osobe), kao i primarne bolesti bubrega koja je dovela do terminalne insuficijencije ovog organa. Jedno od mogućih objašnjenja za ovakvu heterogenost jeste ograničen i relativno mali broj bolesnika koji je bio dostupan u trenutku kada je studija sprovedena. Dinamika kojom se odvijala transplantacija bubrega na teritoriji Republike Srbije u proteklim decenijama imala je velike oscilacije u broju izvedenih intervencija. To se dobrim delom može objasniti teškom finansijskom situacijom, građanskim ratom koji se odvijao u okruženju i ekonomskim sankcijama. Sve navedeno je neminovno nametnulo potrebu da se tokom procesa uključivanja bolesnika u ovo istraživanje uvrste i oni bolesnici kojima je bubreg presađen pre više od 25 godina. Tokom protekle tri decenije, savremeni terapijski protokoli dali su prednost takrolimusu kao savremenijem i efikasnijem leku u odnosu na ciklosporin (169). Međutim, zbog velikog vremenskog obuhvata, u našu studiju je uključen i značajan broj bolesnika koji su primali ciklosporin.

S druge strane, neophodno je istaći i prednosti ove studije koje se ogledaju u činjenici da ispitanici uključeni u ovo istraživanje nisu bili visoko senzibilisani na antigene davaoca, da je postojao relativno balansiran odnos između muškog i ženskog pola, kao i da je ispitivana populacija bila etnički uniformna (svi ispitanici su bili bele rase).

Od posebnog interesa za našu studiju bila je analiza podataka koja se odnosila na utvrđivanje učestalosti ranih komplikacija nakon transplantacije kao što su DGF i AO. Prema podacima iz literature, incidencija DGF se kreće od 15-30% kod bolesnika koji su primili organ od preminule osobe (170). Međutim, ovaj podatak treba uzeti sa rezervom s obzirom da učestalost DGF značajno varira među transplantacionim centrima i može se delimično objasniti nepostojanjem konsenzusa oko definicije DGF (6), ali i uticajem demografskih faktora kao što su rasna pripadnost primaoca (171) i uzrast davaoca (172). U našoj studiji DGF je detektovan kod 27% bolesnika. Direktno poređenje naših podataka sa podacima drugih studija nije lako izvodljivo, s obzirom da su ispitanici u našoj kohorti dobijali bubreg i od žive i od preminule osobe.

AO predstavlja još jednu važnu komplikaciju nakon transplantacije bubrega i u ovoj studiji je utvrđeno kod 32,2% ispitanika. Većina transplantacionih centara u svetu poslednjih dve decenije beleži trend smanjenja incidencije AO primenom savremenih terapijskih protokola. Podaci dobijeni iz United States Renal Data System (<https://www.usrds.org/adr.aspx>; pristupljeno dana 13.6.2018.godine) pokazali su da

incidencija AO iznosi između 10 i 25% unutar prvih godinu dana nakon transplantacije. Daljim uvidom u literaturu, sa posebnim fokusom na istraživanja koja su sprovedena u Evropi, utvrđeno je da ipak postoji veliko variranje u učestalosti AO pri čemu su vrednosti bile u opsegu od 17,2% (93) pa do čak 48,2% (173). Ovako širok raspon u distribuciji AO može se objasniti činjenicom da postoji značajna razlika u dizajnu studija, veličini uzorka, primenjenoj imunosupresivnoj terapiji kao i vremenskom periodu u kome su studije sprovedene. Na osnovu svega navedenog, kao i u prethodnom zapažanju, može se zaključiti da učestalost AO u našem istraživanju ne odstupa van opsega koji je pronađen u literaturi.

Tokom proteklih dvadeset godina, veliki broj genetičkih studija asocijacije se fokusirao na ispitivanje povezanosti pojedinačnih polimorfizama u genima za citokine i ishoda nakon transplantacije bubrega. Dobijeni rezultati su kontradiktorni i efekti pomenutih genskih varijacija na ishod transplantacije zahtevaju dodatna istraživanja.

U ovoj studiji smo po prvi put u populaciji bolesnika sa transplantiranim bubregom u Srbiji ispitali uticaj 11 funkcionalnih polimorfizama u genima *TNFA*, *IL6*, *IL12B*, *IFNG*, *IL10*, *CYP3A5*, *IMPDH1* i *SLCO1B1* na ishod transplantacije.

Analiza frekvencija genotipova i alela gena za citokine kod bolesnika sa transplantiranim bubregom pokazala je da postoji povezanost između polimorfizma +1188A/C, (rs3212227) i DGF i time ukazala na mogućnost da ovaj SNP može da posluži kao biomarker DGF. Naime, ispitanici sa AC genotipom su imali više od dva puta veću šansu da razviju DGF u poređenju sa bolesnicima koji su imali AA genotip. Slična povezanost utvrđena je i kod nosioca recesivnog C alela u odnosu na nosioce A alela. Ovo ukazuje da C alel može biti predisponirajući faktor za razvoj DGF u našoj kohorti.

Uticaj polimorfizma rs3212227 *IL12B* gena na klinički tok nakon transplantacije bubrega nije detaljno ispitan. U literaturi je do danas opisano pet studija koje su sprovedene u Italiji, Velikoj Britaniji, Francuskoj, Kanadi i Poljskoj, ali nijedna od njih nije pokazala asocijaciju između ovog SNP i DGF, AO, hroničnog odbacivanja, kao ni preživljavanja kalema/bolesnika (116-119,174). Stoga, naša studija je prva studija koja je utvrdila povezanost između +1188A/C polimorfizma gena *IL12B* i pojave DGF kod bolesnika sa transplantiranim bubregom. Ovaj nalaz je u suprotnosti sa rezultatima u Francuskoj i Poljskoj studiji koje nisu ustanovile ovi vrstu asocijacije (119,174). Moguće objašnjenje za postojanje ove razlike leži u činjenici da se veličina uzorka koja je korišćena u ovim studijama razlikuje od naše a samim tim i frekvencije recesivnog C

alela. Pored navedenog, ne može se ni prenebregnuti mogućnost da i neki neidentifikovani faktor spoljašnje sredine ili etnički faktor karakterističan za populaciju bolesnika u Srbiji nije doprineo ovoj razlici. Frekvencija C alela u našoj grupi ispitanika (17%) bila je slična kao i u studiji iz Poljske (16%) i odgovarala je distribuciji ovog alela koja je prethodno objavljena za opštu populaciju u Srbiji (162). S druge strane, učestalost ovog alela u populaciji u susednim državama iz regiona i drugim državama Evrope je bila nešto viša u odnosu na onu detektovanu u našoj studiji (Rumunija 22%, Bugarska 23% i Hrvatska, 28%, odnosno u Francuskoj 25%)(114,119,175,176). Interesantno je pomenuti da je u Francuskoj studiji primećen trend da su nosioci C alela imali veći broj AO u prvoj godini u poređenju sa nosiocima AA genotipa iako nije dostignuta statistička značajnost ($p=0.108$). Ovaj rezultat je u skladu sa nalazom u našoj studiji gde je pokazano da C alel može imati predisponirajuću ulogu u razvoju DGF. S druge strane, povezanost ovog alela sa AO nije uočena u grupi bolesnika sa transplantiranim bubregom u Srbiji.

IL12B gen kodira p40 (IL-12B) subjedinicu koja predstavlja konstitutivni deo nekoliko citokinskih molekula. Subjedinica p40 zajedno sa p35 subjedinicom (IL-12A) formira heterodimer i time stvara molekul IL-12, ključni citokin koji polarizuje pomoćničke T-limfocite u Th1-ćelije (177). Takođe, molekul p40 može zajedno sa p19 subjedinicom (IL-23A) da nagradi IL-23 koji je izuzetno važan za proliferaciju, funkciju i preživljavanje Th17 ćelija (178). Obe subpopulacije T-pomoćničkih limfocita (Th1 i Th17) su uključene u imunski odgovor protiv kalem, što može dovesti do njegovog odbacivanja kao i nastanka ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja (179,180). Pa ipak, neka istraživanja govore u prilog da centralnu ulogu u patogenezi DGF ima Th1 imunski odgovor zbog predominantne infiltracije Th1-pomoćničkih ćelija u kalem (69). Gore navedeno sugeriše da IL-12 ima veoma značajnu ulogu u nastanku DGF uprkos činjenici da u ovom trenutku postoji mali broj studija koje bi to i potvrdile. U nekim od tih malobrojnih studija pokazana je veza između povišenih nivoa IL-12 pre i nakon transplantacije bubrega (58,181). Na ovaj podatak se nadovezuje i činjenica da nivoi IL-18 u serumu i urinu, u prvim danima nakon transplantacije, mogu poslužiti kao obećavajući biomarkeri koji predviđaju potrebu za dijalizom (182), a poznato je da ovaj citokin deluje u kooperaciji sa IL-12 u polarizaciji i pojačavanju Th1 imunskog odgovora (183).

Smatra se da je polimorfizam +1188A/C gena *IL12B* funkcionalan i da utiče na ekspresiju odnosno sekreciju IL-12. Međutim, interesantan je podatak da različite studije nisu dale jednoznačne rezultate kada je u pitanju koji od nosilaca ova dva alela (aleli A i C) stvara veće količine subjedinice p40. S jedne strane, nekoliko istraživača je pokazalo da CC genotip dovodi do povećane ekspresije p40 (IL-12B)(111) odnosno veće produkcije IL-12 u kulturi humanih monocita/makrofaga (112,113).

U našoj studiji, identifikovali smo mali broj osoba sa CC genotipom, dok je s druge strane broj individua sa AC genotipom značajan i možemo reći da postoji jasna povezanost ovog genotipa sa DGF. Pretpostavljamo da makrofagi, dendritske i druge ćelije imunskog sistema kod osoba koje su nosioci C alela, produkuju veće količine p40 odnosno IL-12 i time posledično indukuju snažniji Th1 imunski odgovor. Ovakav imunski odgovor kreira inflamatorno okruženje bogato limfocitima/leukocitima koje posledično može indukovati trombozu i ishemiju kalema. Protein p40 je ujedno i subjedinica IL-23, citokina koji je izuzetno značajan za funkciju Th17 ćelija i zato je moguće pretpostaviti da uočena povezanost nosioca C alela sa DGF jeste rezultat pre izmenjenog Th17 nego Th1 imunskog odgovora. Na kraju, poznato je da se IL-12p40 često stvara u višku u odnosu na ostale subjedinice IL-12 (p35) i IL-23 (p19) i da može da postoji kao monomer (IL-12p40) ili homodimer (IL-12p80) (184). Pokazano je da je IL-12p80 povezan sa odbacivanjem alografta zbog svoje sposobnosti da indukuje stvaranje IFN-gama od strane CD8⁺T-limfocita i makrofaga akumuliranih u tkivu kalema (184). Stoga, može se pretpostaviti da prekomerna produkcija p40 može imati sličan efekat i u DGF.

S druge strane, neke studije su pokazale da AA genotip i A alel određuju veću ekspresiju/sekreciju IL-12 u humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (114,115). Ukoliko je ovo zaista tačno, navodna zaštitna uloga A alela (ili AA genotipa) rs3212227 SNP u prevenciji DGF ne izgleda previše očigledna. Pa ipak, hipotetički govoreći, prisustvo A alela može usloviti prekomernu sintezu proteina p40 i stvaranja monomera i homodimera, koji bi se negativnom povratnom spregom kompetitivno vezivali za IL-12 (i/ili IL-23) receptor (184), i time minimizirali štetne efekte ovih citokina u patogenezi DGF. Ono što još može ići u prilog prethodno navedenom je da povećano stvaranje p40 homodimera ostavlja mogućnost da se sada slobodna p35 subjedinica veže za EBI3 subjedinicu i formira citokin IL-35. Ovaj citokin sekretuju predominantno regulatorne B-ćelije (i35-Breg) i T-ćelije (iTR35) (185). Prominentna

antiinflamatorna i regulatorna uloga IL-35 je nedavno demonstrirana u različitim mišjim modelima akutnog oštećenja bubrega i imunskog odgovora na alokalem (186-188). Imajući u vidu sve izneto, može se zaključiti da IL-35 poseduje potencijal da inhibira imunski odgovor na alokalem i spreči seriju događaja koji mogu dovesti do akutnog oštećenja bubrega i DGF.

Naša studija i pored toga što ima mali broj ispitanika sa CC genotipom, sugeriše da postoji povezanost između C alela *IL12B* gena i rizika od nastanka DGF. Ipak, mi ne možemo sa sigurnošću isključiti da analizirani SNP nije u neravnoteži vezanosti sa nekim drugim neotkrivenim polimorfizmom ili pak nekim drugim genetičkim markerom kao što je mikro-RNK ili neki drugi gen u blizini *IL12B* gena.

Kada su u pitanju polimorfizmi u ostalim ispitivanim genima za citokine, u svetu su sprovedene brojne studije koje su imale za cilj utvrđivanje moguće asocijacije između *TNFA*, *IFNG*, *IL6* i *IL10* SNP i ishoda nakon transplantacije bubrega, ali dobijeni rezultati su uglavnom neujednačeni. Naša studija koja je obuhvatila bolesnike sa transplantiranim bubregom u Srbiji nije pokazala da postoji korelacija između SNP u drugim genima za citokine (*TNFA*, *IFNG*, *IL6* i *IL10*) i DGF odnosno AO. Takođe, nijedan od haplotipova i diplotipova tri najčešća *IL10* SNP (-1082G/A, -819C/T i -592C/A) nije udružen sa pojavom DGF ili AR.

U ovoj studiji, po prvi put u Srbiji, određeni su aleli i genotipovi za *TNFA* -308G/A kod bolesnika sa transplantiranim bubregom. Uporednom analizom naših podataka i podataka iz drugih populacija u svetu, utvrdili smo da se frekvencije genotipova GG, GA i AA u rs1800629 polimorfizmu kod bolesnika sa transplantiranim bubregom ne razlikuju statistički značajno u odnosu na populacije: Finske, Češke, Venecuele i Poljske. Međutim, ustanovljena je statistički značajna razlika u distribuciji pomenutih genotipova između naše kohorte i kohorti bolesnika sa transplantiranim bubregom u Južnoj Koreji, Kanadi i Velikoj Britaniji. Postojanje razlike može se objasniti geografskom udaljenošću i specifičnostima vezanim za rasu (žuta rasa predominira u Južnoj Koreji dok u sastavu populacija Kanade i Velike Britanije mogu se naći pripadnici različitih rasa zbog intenzivne imigracije).

U daljem ispitivanju, analizom *TNFA* -308G/A SNP nije ustanovljena udruženost alela i genotipova ovog polimorfizma sa AO i DGF. Kod većeg broja bolesnika u našoj studiji, dijagnoza AO je postavljena na osnovu naglo nastalog pogoršanja bubrežne funkcije čiji su osnovni indikatori bili biohemijski parametri kao što su vrednosti

serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije. U prilog prethodnom nalazu, ide i činjenica da nije utvrđeno statistički značajno variranje u biohemijским parametrima bubrežne funkcije između genotipova *TNFA* -308G/A polimorfizma tokom prve dve godine nakon transplantacije. Polimorfizam rs1800629 u *TNFA* genu spada u jedan od najviše ispitivanih SNP u transplantaciji bubrega. Pregledom literature, koja uključuje dve meta-analize i više od 25 studija, nije moguće doneti jednoznačan zaključak o uticaju ovog SNP na klinički ishod nakon transplantacije bubrega. Potvrda naših rezultata mogla se pronaći u jednoj meta-analizi i nekoliko studija u kojima nije pokazano da postoji udruženost ovog SNP sa AO (92,96,107,189). S druge strane, nekoliko grupa istraživača je ustanovilo da postoji asocijacija između alela i genotipova povezanih sa povećanom produkcijom TNF i većeg rizika od nastanka AO (93,103,110,173,190,191). Do istih zaključaka došli su i Hu i sar. u najnovijoj meta-analizi koja je obuhvatila sve relevantne publikacije do 2011. godine (96). Moguće objašnjenje za ovakvu polarizaciju rezultata najverovatnije leži u osnovi toga da postoje značajne razlike u dizajnu studija, implementiranoj imunosupresivnoj terapiji, kao i u statističkoj analizi (192). Prilikom dizajniranja studija, kod malog broja njih je primenjen konsekutivan odabir tokom perioda uključivanja bolesnika u istraživanje (92,93,190,193). Treba istaći da, za razliku od naše kohorte, u nekim drugim kohortama su bili uključeni i hipersenzibilisani bolesnici i bolesnici kojima je bubreg ponovo transplantiran (93,173,194,195). Snaga primenjenih statističkih testova je bila relativno mala jer u većini studija veličina uzorka nije prelazila 200 ispitanika. Kao posledica malog uzorka, robustniji statistički testovi, koji uzimaju u obzir brojne kofaktore, nisu korišćeni prilikom analize rezultata. Poznato je i da rasna pripadnost ima veliku ulogu na ishod transplantacije ali je i ovaj faktor bio podložan variranju u nekoliko ispitivanja (107,108). Značajna razlika je uočena i u incidenciji AO (opseg 16-63%) jer histološka potvrda AO nije vršena u svim slučajevima (93,190). Treba istaći i da se geni za *TNF* i *HLA* nalaze na istom hromozomu i da postoji izražena neravnoteža vezanosti između ova dva lokusa (196). *TNFA*-308G/A polimorfizam se nalazi unutar proširenog *HLA-A1-B8-DR3-DQ2* haplotipa i mali broj autora uzima u obzir uticaj ovog faktora prilikom analize povezanosti pomenutog polimorfizma i kliničkih ishoda. Na ovaj način se može maskirati ili pak povećati značaj analiziranog SNP, stvarajući time zabludu o postojanju istinske udruženosti sa AO ili DGF. Buduća istraživanja koja će uzeti u obzir sve iznete

nedostake pređašnjih studija mogle bi doprineti boljem razumevanju uloge *TNFA*-308G/A polimorfizma u transplantaciji bubrega.

IL-6 spada u, možda, najintrigantnije citokine i predmet je izučavanja u autoimunskim poremećajima i velikom broju zapaljenskih bolesti. Njegova dvostruka uloga (proinflamatorna i antiinflamatorna) koju ima u toku zapaljenja čini njegovo izučavanje veoma komplikovanim. Poznato je da je IL-6 uključen u stimulaciju alogernih T-limfocita posredstvom inhibicije Treg ćelija. Ova proinflamatorna uloga je dokumentovana u studiji koja je pokazala povezanost između visokih vrednosti IL-6 u serumu pre transplantacije i povećanog rizika od akutnog odbacivanja i gubitka kalema (197). Međutim, ovaj citokin može takođe da deluje i antiinflamatorno tako što antagonizuje dejstvo proinflamatornih citokina IL-1 i TNF, i to indukcijom solubilnog TNF receptora i antagoniste IL-1 receptora (198). I zaista, Wang i sar. su pokazali da IL-6 ima protektivnu ulogu u kasnom akutnom odbacivanju bubrega (7-12 meseci nakon transplantacije). Interesantno je napomenuti da je u istoj studiji uočeno prolazno povećanje ovog citokina kod bolesnika koji su odbacili bubreg unutar mesec dana od transplantacije čime se donekle potvrđuju nalazi iz prethodne studije. Funkcionalni polimorfizmi poput -174G/C, kod kojeg nosioci alela G (GG i GC genotip) imaju povišenu produkciju IL-6, mogu potencijalno uticati na klinički ishod nakon transplantacije bubrega. Analiza ovog SNP nije do sada urađena u populaciji bolesnika sa transplantiranim bubregom u Srbiji tako da je u ovoj doktorskoj disertaciji po prvi put određena frekvencija alela i genotipova u -174G/C polimorfizmu. Rezultati naše analize su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između populacije ispitanika u našoj studiji i populacije bolesnika sa transplantiranim bubregom u Velikoj Britaniji, Finskoj i Poljskoj. Za populacije Venecuele, Kanade i Italije je utvrđeno da se frekvencije genotipova statistički značajno razlikuju u odnosu na našu populaciju bolesnika. Distribucija alela i genotipova u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika nije se statistički razlikovala u odnosu na kohortu satavljenu od bolesnika sa transplantiranim bubregom. Razlike u distribuciji alela i genotipova rs1800795 *IL6* gena u odnosu AO i DGF nisu bile statistički značajne. Dodatno, mi nismo uspeli da detektujemo postojanje statistički značajnog variranja među genotipovima ovog SNP u odnosu na parametre bubrežene funkcije. Pregledom literature može se zaključiti da naši rezultati odgovaraju nalazima u literaturi (102,156,159,189). Međutim, ispitivanje -174G/C polimorfizma u transplantaciji išlo je u još nekoliko pravaca. Analizom

preživljavanja kalema, Muller-Steinhardt i sar. su ustanovili da bolesnici sa CC i GC genotipom imaju značajno lošije trogodišnje preživljavanje transplantiranog bubrega u odnosu na bolesnike sa GG genotipom (199). Protektivni efekat GG genotipa uočila je i grupa istraživača iz Poljske sa razlikom da je kod njih postojao protektivni efekat i kod nocilaca GC genotipa (98). Za razliku od prethodnih studija koje su pratile preživljavanje kalema unutar 3-5 godina naša studija nije imala taj fokus. Naime, u našoj studiji veoma mali broj bolesnika (6/152) je imao kraće preživljavanje kalema od 5 godina te statistička analiza na ovakvom uzorku ne bi bila reprezentativna. Uzimajući u obzir da je u dosadašnjim istraživanjima dominantan antiinflamatoran efekat IL-6 detektovan tek nakon nekoliko meseci od transplantacije bubrega, postoji mogućnost da mi nismo ustanovili postojanje asocijacije između rs1800795 *IL6* gena i AO jer se ono kod svih naših ispitanika javilo unutar prvih 100 dana od transplantacije bubrega. Još jedan od pravaca istraživanja je bio usmeren ka određivanju ovog polimorfizma kod davaoca bubrega. Tako, Canossi i sar. su takođe zaključili da GG genotip davaoca značajno utiče smanjenu incidenciju AO (100). Ovakav pristup je posebno interesantan iz imunološkog aspekta jer na sintezu IL-6, pored mononuklearnih ćelija primaoca koje infiltrišu kalem, utiču i same ćelije transplantiranog bubrega (epitelne ćelije bubrežnih tubula i mezangijalne ćelije). Povišena ekspresija ovog citokina je detektovana u periodu neposredno nakon transplantacije jer ga pomenute ćelije kalema intenzivno stvaraju kao odgovor na povredu koja je nastala usled hiruške intervencije (74,200). Većina studija koja govori u prilog da je -174 (G/C) povezan sa AO su bile dobro dizajnirane i statistički validirane ali su ipak evaluirane u relativno malim kohortama (<160 bolesnika). Neki autori dovode u pitanje funkcionalnu povezanost ovog SNP sa povišenom produkcijom IL-6 jer smatraju da on deluje u okviru haplotipa koji obuhvata još dva polimorfizma rs1800796 (-572G/C) i rs1800797 (-597A/G)(201). Ista grupa istraživača je pokazala i da ovaj haplotip različito utiče na sintezu IL-6 u zavisnosti od vrste tkiva tj. pokazali su da postoji tkivna specifičnost kada je u pitanju ekspresija *IL6* gena. Konačan zaključak o povezanosti ovog SNP sa kliničkim ishodima nakon transplantacije bubrega se ne može doneti i bilo bi preuranjeno govoriti o tome s obzirom na heterogene rezultate studija i činjenicu da IL-6 ima izuzetno kompleksnu ulogu u imunskom odgovoru na alokalem.

IFN-gama predstavlja važan medijator u imunskom odgovoru na alokalem. Povišena ekspresija IFN-gama u krvi, tkivu alokalema i urinu je pronađena kod bolesnika koji su imali AO bubrega što ukazuje na to da ovaj citokin ima potencijano

važnu ulogu u patogenezi ovog procesa (202,203). Ispitivanje genetičkih markera koji bi unapred mogli da ukažu na povećani rizik od AO bio bi od velikog značaja za predviđanje ove komplikacije. Jedan od najčešće ispitivanih funkcionalnih polimorfizama *IFNG* gena je polimorfizam A/T na poziciji +874 (rs2430561) u prvom intronu ovog gena. Ovaj SNP je povezan sa regulacijom genske ekspresije i produkcijom IFN-gama. Naime, utvrđeno je da je nasleđivanje A ili T nukleotida u potpunoj neravnoteži vezanosti sa brojem CA ponovaka koji čine mikrosatelitni marker smešten neposredno uz rs2430561. Korelacija između broja CA ponovaka i produkcije IFN-gama uslovljava da osobe homozigoti za T alel proizvode značajno više IFN-gama nego osobe sa drugim genotipom. Takođe je uočeno da se T alel nasleđuje zajedno sa nizom od 12 CA ponovaka i da je prisustvo timina na poziciji +874 neophodno za specifično vezivanje transkripcionog faktora NFκB (101).

Aleli i genotipovi +874 T/A *IFNG* pokazuju različitu distribuciju u svetu u zavisnosti od geografskog regiona. Frekvencije genotipova ovog SNP u našoj populaciji su bile uporedive sa distribucijama genotipova u populacijama iz drugih geografskih regiona sa izuzetkom Venecule. U ovom slučaju je utvrđena visoko statistički značajna razlika u distribuciji genotipova AA, AT i TT između naše kohorte i kohorte iz Venecule. Detektovana razlika je najverovatnije posledica postojanja rasnih specifičnosti kao i geografske udaljenosti između ove dve populacije. U našoj studiji smo pokazali i da ne postoji povezanost između polimorfizma rs2430561 i ranih kliničkih komplikacija. Takođe, biohemijski parametri bubrežne funkcije, mereni u određenim vremenskim intervalima, nisu statistički značajno varirali u odnosu na genotip. Pregledom podataka iz baze Medline, uočili smo da nijedna studija koja je brojala više od 100 ispitanika nije utvrdila da postoji povezanost između ovog SNP i AO ili DGF. Međutim, meta-analiza koju su uradili Ge i sar. je pokazala da ipak postoji udruženost između +874 T/A *IFNG* polimorfizma i AO (204). Iako nalazi koji se dobijaju meta-analizom imaju specifičnu težinu u donošenju preliminarnih zaključaka u studijama asocijacije i ovde treba biti obazriv i pomenuti neka njena ograničenja koja su istakli i sami autori. Kao prvo, u ovu meta-analizu nisu uključene sve do tada objavljene studije koje su ispitivale povezanost ovog polimorfizma sa AO. Ovim se smanjio ukupan broj ispitanika i statistička moć primenjenih testova. Drugo, frekvencije alela i genotipova +874 T/A *IFNG* polimorfizma među različitim etničkim grupama su značajno varirale, pogotovo u populaciji Afro-Amerikanaca i azijskoj populaciji, te time analiza unutar podgrupa nije bila moguća. I

treće, podaci o polu, uzrastu, prisustvu anti-HLA antitela, broju nepodudaranja u okviru HLA lokusa i primenjenom imunosupresivnom protokolu nisu bili dostupni za sve studije i stoga nisu mogli da se isključe uticaji ovih kofaktora na AO. Pomenuti podaci o kofaktorima su bili dostupni za analizu u našoj studiji ali nisu značajno uticali na povezanost ovog lokusa sa nepovoljnim kliničkim ishodima (rezultati ove analize nisu prikazani u doktorskoj disertaciji). Nedostatak asocijacije u našoj studiji verovatno ukazuje da ove genska varijanta u *IFNG* nema potencijal da se koristi kao biomarker akutnog oštećenja kod bolesnika sa transplantiranim bubregom u Srbiji.

Imunski odgovor usmeren protiv alokalema je determinisan balansom između proinflamatornih i antiinflamatornih citokina (205). IL-10 spada u grupu imunomodulatornih citokina koji ispoljava snažan imunosupresivan i antiinflamatoran efekat tako što ihibira stvaranje TNF, IL-1, IL-6, IL-8 i IL-12 u monocitima/makrofagima i IFN-gama u T-limfocitima (206). Pokazano je da je ekspresija ovog citokina genski determinisana sa 3 SNP : -1082G/A (rs1800896), -819 C/T (rs1800871) i -592C/A (rs1800872) koji se nalaze u promotoru IL10 gena. Eksperimentalni podaci ukazuju da polimorfizmi -1082G/A i -592C/A mogu nezavisno uticati na ekspresiju IL-10 mada se u literaturi većina istraživača odlučuje da razmatra ovaj genetički fenomen u kontekstu kombinacije funkcionalnih haplotipova: GCC/GCC (visoka ekspresija), GCC/ACC ili GCC/ATA (umerena ekspresija) i ATA/ATA (mala ekspresija) (110,207).

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je i da se analizira distribucija alela i genotipova ovih SNP u populaciji bolesnika sa transplantiranim bubregom u Srbiji. Prva dva polimorfizma (rs1800896 i rs1800871) su analizirana TaqMan PCR metodom, dok su genotipovi za treći polimorfizam (rs1800872) izvedeni iz SNP rs1800871 jer je ustanovljeno da su ova dva SNP u potpunoj neravnoteži vezanosti kod belaca (164). Upotrebom posebnog softvera i algoritma maksimizacije očekivanja dobijena su četiri haplotipa od mogućih osam: GCC, ACC, GTA i ATA. Interesantno je pomenuti da su u našoj kohorti identifikovana tri bolesnika sa GTA haplotipom koji se smatra veoma retkim u populaciji belaca. S obzirom da je učestalost ovog haplotipa u našoj kohorti niska i da nije identifikovan u populaciji zdravih ispitanika, detaljno je proverena verodostojnost ovog nalaza tako što su individue sa ovim haplotipom ponovo analizirane pomoću TaqMan eseja. Ponovljena analiza dala je istovetne rezultate mada ne možemo u potpunosti da elimišemo mogućnost greške jer nismo imali priliku da sekvenciramo ovaj deo genoma. Sličan rezultat je dobijen i u populaciji bolesnika sa

inflamatornom bolešću creva u Srbiji, u kojoj je GTA haplotip identifikovan kod jednog ispitanika (208). U literaturi postoje podaci koji govore da frekvencija ovog haplotipa u evropskoj populaciji belaca značajno varira i to od 0% do 12,3% (209,210). Tako na primer, Boiardi i sar. su ustanovili da se pomenuti haplotip javlja i u populaciji zdravih ljudi (12,3%) kao i u populaciji obolelih od arteritisa džinovskih ćelija (3,9%) (210). Takođe, ovaj haplotip je identifikovan u jednoj holandskoj porodici gde se stabilno nasleđivao kroz generacije (211). Ovim je nesumljivo pokazano da GTA haplotip perzistira kod ljudi bele rase u niskom procentu ali njegov značaj i funkciju tek treba utvrditi u budućim istraživanjima.

Analiza distribucije ispitivanih alela, genotipova i haplotipova *IL10* gena nije utvrdila da postoji statistički značajna razlika između kontrolne grupe zdravih ljudi i grupe bolesnika sa transplantiranim bubregom. Distribucija genotipova polimorfizama rs1800896 i rs1800871 u našoj kohorti se statistički značajno razlikovala u odnosu na populacije bolesnika sa transplantiranim bubregom iz geografski udaljenih država kao što su Meksiko i Venecuela, odnosno populaciju Velike Britanije u kojoj je posebno naglašen rasni diverzitet zbog imigracije i kolonijalne prošlosti. U daljem ispitivanju, nijedan od alela, genotipova, kao i haplotipova ispitivanih SNP u *IL10* nije pokazao udruženost sa DGF i AO. Takođe, u našem istraživanju nije detektovana ni povezanost pomenutih genetičkih parametara sa vrednostima serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije. Ipak, možda bi bilo od značaja pomenuti da rezultati naše studije pokazuju da kod osoba sa *IL10* diplotipom (ATA/ATA), koji je označen kao diplotip sa smanjenom sintezom IL-10, postoji trend ka višim vrednostima nivoa serumskog kreatinina i proteinurije kao i nižim vrednostima klirensa kreatinina u prvoj godini nakon transplantacije. Uprkos tome što nije dostignuta statistička značajnost, ovaj trend koji predstavlja korelaciju „niskoprodukujućeg“ genotipa sa parametrima vezanim za lošiju funkciju alokalema, u saglasnosti je sa protektivnom antiinflamatornom ulogom IL-10 u imunskom odgovoru. U prilog ovoj tvrdnji ide i podatak da izostanak regulatornih mehanizama predstavlja ključni faktor u oštećenju presađenog bubrega (95,118).

Rezultati naše analize ne ukazuju da tri ispitivana polimorfizma u promotoru gena za IL-10 imaju bitnu ulogu u patogenezi AO i DGF nakon transplantacije bubrega. Ovakav zaključak su izveli i autori dve meta-analize koji su sublimirali rezultate preko dvadeset relevantnih studija iz ove oblasti (212). U pojedinačnim studijama postoje

kontradiktorni rezultati. Grinyo i sar. su pokazali da postoji skoro pet puta veći rizik od AO kod bolesnika sa AA genotipom (niska produkcija IL-10) u odnosu na nosioce AC/CC genotipa (umerena/velika produkcija IL-10)(110). Ova multicentrična studija je razmatrala pomenutu asocijaciju uzimajući brojne faktore rizika sa nivoom značajnosti $p < 0,1$ kao što je uzrast ($<50/>50$ godina), pol, vrsta kalema i vrsta imunosupresivne terapije. Višestruki binarni regresioni model je pokazao da pored AA genotipa i njemu pridruženi haplotip ATA takođe predstavlja faktor rizika za pojavu AO. Druge, pojedinačne studije su brojile znatno manji broj ispitanika a samim tim je i značajno redukovana moć statističkih testova koji su korišćeni za analizu (102,213). Hutchings i sar. su pokazali da je polimorfizam -1082G/A u *IL10* genu odnosno AA genotip povezan sa pojavom jedne ili više epizoda AO u populaciji Afro-Amerikanaca ali ne i u populaciji belaca (107). Na prvi pogled, ovakva asocijacija predstavlja paradoks s obzirom na to da ovaj citokin ima antiinflamatorne efekte. Međutim, IL-10 je potentan stimulator aktivacije i diferencijacije B-limfocita čime se pojačava humoralni imunski odgovor i produkcija antitela na alokalem (214). U prilog ovome ide i nalaz povećane ekspresije *IL10* gena unutar samog kalema kod bolesnika koji su imali AO (215). I na kraju, treba pomenuti da se negativni efekti povećane ekspresije IL-10 mogu videti i kod hroničnog odbacivanja bubrega gde u velikoj meri doprinosi atrofiji tubula (216).

Na osnovu izloženog može se zaključiti da IL-10 ima važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora na alokalem. Aberantna ekspresija IL-10, koja je delom determinisana i polimorfizmima ovog gena, može dovesti do oštećenja presađenog bubrega i uticati na ishod transplantacije. U ovom trenutku, eksperimentalni podaci iz naše i brojnih drugih studija upućuju da ispitivani SNP (-1082G/A, -819 C/T i -592C/A) nisu povezani sa AO i DGF nakon transplantacije bubrega.

U ovoj studiji ispitali smo i distribuciju alela i genotipova polimorfizama gena koji kodiraju proteine uključene u metabolizam (rs776746, *CYP3A5*) kao i transport imunosupresivnih lekova kroz membranu hepatocita (rs2306283 i rs4149056 *SLCO1B1*). Lekovi koji se koriste u imunosupresivnoj terapiji, poput ciklosporina, takrolimusa i MFK, imaju veoma veliko variranje u farmakokinetici leka, usku terapijsku širinu i čitav spektar potencijalno neželjenih efekata (217,218). Farmakogenetička istraživanja su pružila novu nadu kliničarima kako bi postigli optimalnije koncentracije leka u krvi, naročito u prvim danima nakon transplantacije kada je terapijsko praćenje leka veoma otežano (219).

Iako je do sada identifikovan veliki broj genetičkih faktora koji mogu da utiču na farmakodinamiku i farmakokinetiku imunosupresivnih lekova, jedino je polimorfizam rs776746 gena *CYP3A5* izdržao rigorozno testiranje u kliničkim studijama. Zbog svoje važne uloge u metabolizmu takrolimusa ovaj SNP je dodatno uvršten u naše istraživanje. Ovaj genski lokus može sadržati dva alela, A alel koji je povezan sa normalnom aktivnošću *CYP3A5* i alel G koji u homozigotnom stanju ne dovodi do ekspresije pomenutog enzima. Nosioци A alela (*CYP3A5*1*) značajno brže metabolišu takrolimus i zahtevaju veće doze leka u odnosu na nosioce GG genotipa (*CYP3A5*3*3*)(145,220). Distribucija nefunkcionalnog alela u svetu značajno varira u zavisnosti od etničke pripadnosti i u populaciji bele rase može obuhvatiti preko 90% pripadnika (221). U populaciji Srbije, frekvencija G alela je ispitivana u nekoliko studija i varirala je od 91,8% do 97,5% (222,223). Međutim, u našoj studiji frekvencija G alela je bila 100% što ukazuje da nijedan od ispitanika ne ispoljava funkcionalnu formu *CYP3A5* enzima. Razlika između naše i pomenutih studija u Srbiji ogleda se u primeni različitih metoda za utvrđivanje distribucije alela (genotipizaciju). U jednoj od studija je korišćen RFLP-PCR metod (*engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism, polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcionom digestijom, RFLP) dok se u drugoj nije moglo jasno zaključiti kakav je metod upotrebljen za genotipizaciju. Danas se smatra da TaqMan esej ima istovetnu tačnost kao metoda sekvenciranja i da ima bolju moć diskriminacije alela u odnosu na PCR-RFLP. Ukoliko se naši rezultati uzmu kao validni, može se zaključiti da polimorfizam rs776746 ima veoma ograničenu upotrebnu vrednost kao genetički biomarker u našoj populaciji.

Na farmakokinetiku imunosupresivnih lekova značajno utiču i proteini koji vrše njihov transport kroz ćelijske membrane. Jedan od transportera MFK je i transporter organskih anjona polipeptid B1. OATP1B1 se nalazi na membrani hepatocita gde olakšava preuzimanje mnogih lekova iz cirkulacije i time pospešuje njihovu eliminaciju iz organizma. Interindividualne razlike u transportu lekova mogu biti posledica genskih varijacija kao što su polimorfizmi na nivou pojedinačnog nukleotida. U *SLC01B1* genu koji kodira ovaj protein nalaze se dva veoma važna funkcionalna SNP (+388A/G, rs2306283 i +521T/C, rs4149056). Oni formiraju četiri haplotipa: *SLC01B1*1B* (388G-521T), *SLC01B1*1A* (388A-521T), *SLC01B1*15* (388G-521C), *SLC01B1*5* (388A-521C) od kojih samo za poslednji postoje jasni dokazi da utiče na smanjenu transportnu aktivnost OATP1B1 (224,225). U *in vitro* ekperimentima, Michelon i sar. su

demonstrirali da OATP1B1 transportuje aktivne metabolite MFK kao što su fenil-glukuronid MFK i acil-glukuronid MFK. Isti grupa autora je pokazala da alel C na poziciji 521 (+521T/C) nosi značajno manji rizik od neželjenih efekata MFK jer smanjuje enterohepatičnu recirkulaciju leka (137). Njihovo istraživanje nije pokazalo da ovaj SNP koreliše sa AO što je u suprotnosti sa nalazima grupe istraživača iz Brazila (168). U brazilskoj studiji je pokazana da nosioci alela G imaju značajnu manju šansu za nastanak AO što je neočekivan nalaz jer je ovaj alel povezan sa intezivnim transportom lekova (225). S obzirom na postojanje kontradiktornih rezultata u literaturi, mi smo postavili za cilj da ispitamo da li postoji povezanost između ovih SNP i AO odnosno DGF.

Upotreba dva različita kalcineurinska inhibitora nije dozvoljavala da se u analizu uključe svi ispitanici. Početni broj od 152 bolesnika je morao biti redukovan na 84 kako bi se uniformisala grupa po pitanju primenjenog terapijskog protokola. Grupa bolesnika lečena takrolimusom i preparatima mikofenolične kiseline je odabrana iz dva razloga: 1) bila je veća od grupe bolesnika koji su primali ciklosporin, 2) ciklosporin inhibira transportnu aktivnost OATP1B1 što dodatno komplikuje interpretaciju rezultata (226). Distribucija alela i genotipova polimorfizama rs2306283 i rs4149056 u našoj kohorti nije se značajno razlikovala u odnosu na podatke iz drugih država. U redukovanoj grupi nije utvrđeno postojanje povezanosti ispitivanih SNP sa ranim komplikacijama nakon transplantacije bubrega. Odsustvo korelacije između pomenutih SNP u *SLC01B1* genu i biohemijskih parametara funkcije bubrega je bio očekivan nalaz s obzirom da je kod većine bolesnika dijagnoza AO postavljena upravo na osnovu njihove promene. Naše rezultate trenutno možemo upoređivati samo sa nalazima dve dostupne studije. Jedino su Alves i sar. utvrdili da postoji asocijacija između AO i polimorfizama u *SLC01B1* genu (168). Međutim, u ovom istraživanju postoji niz nedoslednosti i nejasnoća: 1) zbir svih genotipova u okviru ispitivanih SNP ne odgovara prijavljenom broju bolesnika koji su uključeni u studiju, 2) autori su korelisali genotipove i haplotipove *SLC01B1* gena sa koncentracijom takrolimusa u krvi iako u literaturi postoje eksperimentalni dokazi da OATP1B1 nije transporter ovog leka, 3) postoji kontradiktoran nalaz u kome je pokazano da bolesnici sa niskom koncentracijom takrolimusa u krvi imaju manju šansu da razviju AO. Zbog svega navedenog, nalaze ove studije uzimamo sa velikom rezervom. Naša studija takođe ima ograničenja od kojih treba svakako izdvojiti mali uzorak. Pored toga, bilo bi interesatno da je postojala mogućnost da se ispita udruženost određenih genotipova sa koncentracijom MFK u krvi ili pojavom neželjenih efekata ove terapije. Za

sada, određivanje koncentracije MFK u krvi još uvek nije deo standardnih kliničkih protokola jer značajno poskupljuje već ionako visoku cenu lečenja bolesnika sa transplantiranim bubregom. Utvrđivanje eventualne uloge polimorfizama *SLCO1B1* gena u transplantaciji bubrega predstavlja delikatan i složen zadatak koji uključuje brižljivo planiranje i odabir ispitanika kako bi se studijska grupa učinila što homogenijom. Naši rezultati su dobijeni na malom uzorku ali mogu biti od koristi za neku buduću meta-analizu.

Još jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je bilo ispitivanje polimorfizma rs2278294 u genu za inozin 5'-monofosfat dehidrogenazu 1, s obzirom da MFK inhibira delovanje ovog važnog enzima uključenog u proliferaciju T i B-limfocita. Nekoliko prethodnih studija su pokazale da polimorfizmi u *IMPDH1* i *IMPDH2* genima mogu da interferiraju sa farmakološkim odgovorom MFK (142-144). Dve farmakogenetičke studije su utvrdile asocijaciju genskih varijanti u intronu *IMPDH1* (rs2278293 i rs2278294) i AO tokom prve godine nakon tansplantacije (150,166). Kako bi uporedili rezultate ovih studija sa našom kohortom, određeni su genotipovi polimorfizma - 106G/A (rs2278294) u populaciji bolesnika sa transplantiranim bubregom u Srbiji. U našoj analizi smo utvrdili da distribucija genotipova ispitivanog SNP nije bila u Hardy-Weinberg ravnoteži u grupi od 84 bolesnika lečenih takrolimusom i MFK. I pored odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže, distribucija alela i genotipova polimorfizma rs2278294 u redukovanoj grupi nije se značajno razlikovala u odnosu na podatke iz drugih država. Interesantno je napomenuti da odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže nije detektovano u celokupnoj grupi od 152 bolesnika i trenutno se ne može naći objašnjenje za ovo odstupanje unutar evaluirane podgrupe. U daljoj analizi grupe od 84 bolesnika nije utvrđena povezanost između ispitivanog SNP i AO odnosno DGF. Takođe, nije utvrđena ni povezanost SNP ovog gena sa biohemijskim parametrima funkcije bubrega što je u saglasnosti sa prethodno pomenutim rezultatima. Mogući razlog zbog kojeg nismo u našoj studiji mogli da replikujemo rezultate iz prethodnih studija jeste način na koji su definisane i potvrđene dijagnoze AO i DGF. U prethodnim studijama AO je potvrđena biopsijom dok je u našem slučaju ovakav način postavljanja dijagnoze AO bio primenjen kod manjeg broja pacijenata. Takođe, drugi kofaktori kao što su etnička pripadnost, upotreba različitih modifikacija mikofenolične kiseline za imunsku supresiju, uzrast bolesnika, kao i neki drugi genetički faktori mogu doprineti da se rezultati razlikuju.

Uprkos napretku u tehnologiji i metodama transplantacije, rane komplikacije nakon transplantacije bubrega i dalje predstavljaju veliki klinički izazov. Razumevanje faktora koji uzrokuju pojavu AO ili DGF nakon transplantacije bubrega mogu omogućiti primenu novih lekova i bolje lečenje. Genetičke studije asocijacije su pokazale da polimorfizmi na nivou pojedinačnih nukleotida, uprkos brojnim ograničenjima, mogu poslužiti kao potencijalni biomarkeri u predviđanju komplikacija kao što su akutno odbacivanje ili odložena funkcija kalema kod bolesnika sa transplantiranim bubregom. Naše istraživanje predstavlja prvu studiju u Srbiji u kojoj su analizirani aleli i genotipovi polimorfizama gena za citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport imunosupresivnih lekova. Kao rezultat toga, u ovoj studiji je po prvi put u jednoj populaciji uočena udruženost između AA genotipa u polimorfizmu +1188A/C (rs3212227) u *IL12B* genu i manjeg rizika od nastanka odložene funkcije kalema, ukazujući na potencijalnu važnu protektivnu ulogu tog polimorfizma u patogenezi DGF i njegovu moguću upotrebu kao biomakera u proceni rizika za razvoj ove rane komplikacije nakon transplantacije bubrega. Buduće studije sa većim brojem ispitanika u našoj i drugim populacijama bi mogle da procene značaj i klinički potencijal ovakvog nalaza ove doktorske disertacije.

6. Zaključci

1. Ispitivanjem polimorfizama gena za TNF (rs1800629), IL-6 (rs1800795), IFN-gama (rs2430561) i IL-10 (rs1800896, rs1800871 i rs1800872):

- nije utvrđeno da su ovi polimorfizmi povezani sa pojavom akutnog odbacivanja ili odložene funkcije kalema nakon transplantacije bubrega
- nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije između ispitivanih genotipova navedenih polimorfizama
- poređenjem formiranih haplotipova *IL10* gena kod bolesnika koji su imali AO i DGF sa grupom koji nisu imali ove komplikacije nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u njihovoj distribuciji
- nije utvrđena korelacija haplotipova *IL10* gena sa biohemijskim parametrima funkcije bubrega nakon transplantacije

2. Ispitivanjem polimorfizma (rs 3212227) *IL12B* gena:

- nije utvrđeno da je ovaj polimorfizam udružen sa akutnim odbacivanjem bubrega
- utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova u odnosu na DGF, pri čemu AC genotip predstavlja faktor rizika dok AA genotip ima protektivnu ulogu
- nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije između ispitivanih genotipova ovog polimorfizma

3. Ispitivanjem polimorfizama *IMPDH1* (rs2278294) i *SLCO1B1* (rs2306283 i s4149056) gena:

- nije utvrđeno da su ovi polimorfizmi udruženi sa pojavom akutnog odbacivanja ili odložene funkcije kalema nakon transplantacije bubrega
- nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima serumskog kreatinina, klirensa kreatinina i proteinurije između ispitivanih genotipova ovih polimorfizma
- poređenjem formiranih haplotipova *SLCO1B1* gena kod bolesnika koji su imali AO i DGF sa grupom koji nisu imali ove komplikacije nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u njihovoj distribuciji

4. Ispitivanje polimorfizma (rs776746) *CYP3A5* gena

- pokazalo je da ovaj lokus nije polimorfan u našoj kohorti jer su svi bolesnici bili homozigoti za G alel.

7.Literatura

1. Schieppati A, Remuzzi G, 2005. Chronic renal diseases as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications. *Kidney Int Suppl*, S7-S10. [[PubMed](#)]
2. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, Klarenbach S, Gill J, 2011. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant* 11, 2093-2109. [[PubMed](#)]
3. Legendre C, Kreis H, 2010. A tribute to Jean Hamburger's contribution to organ transplantation. *Am J Transplant* 10, 2392-2395. [[PubMed](#)]
4. Petechuk D, 2006. Organ transplantation. Greenwood Press, Westport, Conn., xiii, 195 p. pp.
5. Guild WR, Harrison JH, Merrill JP, Murray J, 1955. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 67, 167-173. [[PubMed](#)]
6. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, Doshi M, Poggio E, Marcus RJ, Parikh CR, 2008. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant* 23, 2995-3003. [[PubMed](#)]
7. Nashan B, Abbud-Filho M, Citterio F, 2016. Prediction, prevention, and management of delayed graft function: where are we now? *Clin Transplant* 30, 1198-1208. [[PubMed](#)]
8. Hassanain M, Tchervenkov J, Cantarovich M, Metrakos P, Paraskevas S, Keith D, Baran D, Fernandez M, Mangel R, Chaudhury P, 2009. Delayed graft function has an equally bad impact on deceased donor renal graft survival in both standard criteria donors and expanded criteria donors. *Transplant Proc* 41, 133-134. [[PubMed](#)]
9. Sharif A, Borrows R, 2013. Delayed graft function after kidney transplantation: the clinical perspective. *Am J Kidney Dis* 62, 150-158. [[PubMed](#)]
10. Kayler LK, Magliocca J, Zendejas I, Srinivas TR, Schold JD, 2011. Impact of cold ischemia time on graft survival among ECD transplant recipients: a paired kidney analysis. *Am J Transplant* 11, 2647-2656. [[PubMed](#)]
11. Kayler LK, Srinivas TR, Schold JD, 2011. Influence of CIT-induced DGF on kidney transplant outcomes. *Am J Transplant* 11, 2657-2664. [[PubMed](#)]
12. Wu WK, Famure O, Li Y, Kim SJ, 2015. Delayed graft function and the risk of acute rejection in the modern era of kidney transplantation. *Kidney Int* 88, 851-858. [[PubMed](#)]
13. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B, 2004. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 4, 378-383. [[PubMed](#)]
14. Nashan B, 2009. Is acute rejection the key predictor for long-term outcomes after renal transplantation when comparing calcineurin inhibitors? *Transplant Rev (Orlando)* 23, 47-52. [[PubMed](#)]
15. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU, 2011. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 11, 450-462. [[PubMed](#)]
16. Gondos A, Dohler B, Brenner H, Opelz G, 2013. Kidney graft survival in Europe and the United States: strikingly different long-term outcomes. *Transplantation* 95, 267-274. [[PubMed](#)]
17. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Lamb KE, Gustafson SK, Samana CJ, Stewart DE, Snyder JJ, Israni AK, Kasiske BL, 2013. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant* 13 Suppl 1, 11-46. [[PubMed](#)]
18. Frei U, Noeldeke J, Machold-Fabrizii V, Arbogast H, Margreiter R, Fricke L, Voiculescu A, Kliem V, Ebel H, Albert U, Lopau K, Schnuelle P, Nonnast-Daniel B, Pietruck F, Offermann R, Persijn G, Bernasconi C, 2008. Prospective age-matching in elderly kidney transplant recipients--a 5-year analysis of the Eurotransplant Senior Program. *Am J Transplant* 8, 50-57. [[PubMed](#)]

19. Boesmueller C, Biebl M, Scheidl S, Oellinger R, Margreiter C, Pratschke J, Margreiter R, Schneeberger S, 2011. Long-term outcome in kidney transplant recipients over 70 years in the Eurotransplant Senior Kidney Transplant Program: a single center experience. *Transplantation* 92, 210-216. [[PubMed](#)]
20. Canaud G, Audard V, Kofman T, Lang P, Legendre C, Grimbert P, 2012. Recurrence from primary and secondary glomerulopathy after renal transplant. *Transpl Int* 25, 812-824. [[PubMed](#)]
21. Floege J, Grone HJ, 2013. Recurrent IgA nephropathy in the renal allograft: not a benign condition. *Nephrol Dial Transplant* 28, 1070-1073. [[PubMed](#)]
22. Opelz G, Dohler B, 2013. Ceppellini Lecture 2012: collateral damage from HLA mismatching in kidney transplantation. *Tissue Antigens* 82, 235-242. [[PubMed](#)]
23. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, Bray RA, Gebel HM, Matas AJ, 2011. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant* 11, 2132-2143. [[PubMed](#)]
24. Cole EH, Johnston O, Rose CL, Gill JS, 2008. Impact of acute rejection and new-onset diabetes on long-term transplant graft and patient survival. *Clin J Am Soc Nephrol* 3, 814-821. [[PubMed](#)]
25. Opelz G, Mytilineos J, Scherer S, Dunckley H, Trejaut J, Chapman J, Middleton D, Savage D, Fischer O, Bignon JD, et al., 1991. Survival of DNA HLA-DR typed and matched cadaver kidney transplants. The Collaborative Transplant Study. *Lancet* 338, 461-463. [[PubMed](#)]
26. Doxiadis II, de Fijter JW, Mallat MJ, Haasnoot GW, Ringers J, Persijn GG, Claas FH, 2007. Simpler and equitable allocation of kidneys from postmortem donors primarily based on full HLA-DR compatibility. *Transplantation* 83, 1207-1213. [[PubMed](#)]
27. Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J, 1999. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1, 334-342. [[PubMed](#)]
28. Zantvoort FA, D'Amaro J, Persijn GG, Cohen B, Schreuder GM, Van Rood JJ, Thorogood J, 1996. The impact of HLA-A matching on long-term survival of renal allografts. *Transplantation* 61, 841-844. [[PubMed](#)]
29. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Famulski K, Matas A, Halloran PF, 2012. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 12, 388-399. [[PubMed](#)]
30. Pallet N, Thervet E, Alberti C, Emal-Aglae V, Bedrossian J, Martinez F, Roy C, Legendre C, 2005. Kidney transplant in black recipients: are African Europeans different from African Americans? *Am J Transplant* 5, 2682-2687. [[PubMed](#)]
31. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS, 1999. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol* 162, 352-358. [[PubMed](#)]
32. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI, 2001. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol* 167, 7199-7206. [[PubMed](#)]
33. Gould DS, Auchincloss H, Jr., 1999. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 20, 77-82. [[PubMed](#)]
34. Ingulli E, 2010. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol* 25, 61-74. [[PubMed](#)]

35. Chadha R, Heidt S, Jones ND, Wood KJ, 2011. Th17: contributors to allograft rejection and a barrier to the induction of transplantation tolerance? *Transplantation* 91, 939-945. [[PubMed](#)]
36. Wood KJ, Bushell A, Hester J, 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* 12, 417-430. [[PubMed](#)]
37. Chung BH, Kim KW, Kim BM, Doh KC, Cho ML, Yang CW, 2015. Increase of Th17 Cell Phenotype in Kidney Transplant Recipients with Chronic Allograft Dysfunction. *PLoS One* 10, e0145258. [[PubMed](#)]
38. Lund FE, Randall TD, 2010. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 10, 236-247. [[PubMed](#)]
39. Clatworthy MR, 2011. Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am J Transplant* 11, 1359-1367. [[PubMed](#)]
40. Cucchiari D, Podesta MA, Ponticelli C, 2016. The Critical Role of Innate Immunity in Kidney Transplantation. *Nephron* 132, 227-237. [[PubMed](#)]
41. Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J, 2012. The renal mononuclear phagocytic system. *J Am Soc Nephrol* 23, 194-203. [[PubMed](#)]
42. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H, 2002. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80, 477-483. [[PubMed](#)]
43. Nouri-Shirazi M, Thomson AW, 2006. Dendritic cells as promoters of transplant tolerance. *Expert Opin Biol Ther* 6, 325-339. [[PubMed](#)]
44. Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Rossner S, Schuler G, Austyn JM, 2000. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* 30, 1813-1822. [[PubMed](#)]
45. Taner T, Hackstein H, Wang Z, Morelli AE, Thomson AW, 2005. Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant* 5, 228-236. [[PubMed](#)]
46. Shikanov S, Lifshitz D, Chan AA, Okhunov Z, Ordonez MA, Wheat JC, Matin SF, Landman J, Wolf JS, Jr., Eggener SE, Shalhav AL, 2010. Impact of ischemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy: a multicenter study. *J Urol* 183, 1714-1718. [[PubMed](#)]
47. El-Sawy T, Miura M, Fairchild R, 2004. Early T cell response to allografts occurring prior to alloantigen priming up-regulates innate-mediated inflammation and graft necrosis. *Am J Pathol* 165, 147-157. [[PubMed](#)]
48. Liu Y, Kloc M, Li XC, 2016. Macrophages as Effectors of Acute and Chronic Allograft Injury. *Curr Transplant Rep* 3, 303-312. [[PubMed](#)]
49. Qi F, Adair A, Ferenbach D, Vass DG, Mylonas KJ, Kipari T, Clay M, Kluth DC, Hughes J, Marson LP, 2008. Depletion of cells of monocyte lineage prevents loss of renal microvasculature in murine kidney transplantation. *Transplantation* 86, 1267-1274. [[PubMed](#)]
50. Schaefer N, Tahara K, von Websky M, Wehner S, Pech T, Tolba R, Abu-Elmagd K, Kalff JC, Hirner A, Turler A, 2008. Role of resident macrophages in the immunologic response and smooth muscle dysfunction during acute allograft rejection after intestinal transplantation. *Transpl Int* 21, 778-791. [[PubMed](#)]
51. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Genderachter JA,

- Vogel SN, Wynn TA, 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41, 14-20. [[PubMed](#)]
52. Jose MD, Ikezumi Y, van Rooijen N, Atkins RC, Chadban SJ, 2003. Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 76, 1015-1022. [[PubMed](#)]
53. Kipari T, Cailhier JF, Ferenbach D, Watson S, Houlberg K, Walbaum D, Clay S, Savill J, Hughes J, 2006. Nitric oxide is an important mediator of renal tubular epithelial cell death in vitro and in murine experimental hydronephrosis. *Am J Pathol* 169, 388-399. [[PubMed](#)]
54. Kloc M, Ghobrial RM, 2014. Chronic allograft rejection: A significant hurdle to transplant success. *Burns Trauma* 2, 3-10. [[PubMed](#)]
55. Toki D, Zhang W, Hor KL, Liuwantara D, Alexander SI, Yi Z, Sharma R, Chapman JR, Nankivell BJ, Murphy B, O'Connell PJ, 2014. The role of macrophages in the development of human renal allograft fibrosis in the first year after transplantation. *Am J Transplant* 14, 2126-2136. [[PubMed](#)]
56. Mitchell RN, 2009. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annu Rev Pathol* 4, 19-47. [[PubMed](#)]
57. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, Cantley LG, 2011. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol* 22, 317-326. [[PubMed](#)]
58. Fitzgerald JT, Johnson JR, Perez RV, 2004. Pre-transplant elevations of interleukin-12 and interleukin-10 are associated with acute rejection after renal transplantation. *Clin Transplant* 18, 434-439. [[PubMed](#)]
59. Mota AP, Vilaca SS, das Mercedes FL, Jr., Pinheiro Mde B, Teixeira-Carvalho A, Silveira AC, Martins-Filho OA, Gomes KB, Dusse LM, 2013. Cytokines signatures in short and long-term stable renal transplanted patients. *Cytokine* 62, 302-309. [[PubMed](#)]
60. Woloszczuk W, Schwarz M, Havel M, Laczkovics A, Muller MM, 1986. Neopterin and interferon gamma serum levels in patients with heart and kidney transplants. *J Clin Chem Clin Biochem* 24, 729-734. [[PubMed](#)]
61. Famulski KS, Einecke G, Reeve J, Ramassar V, Allanach K, Mueller T, Hidalgo LG, Zhu LF, Halloran PF, 2006. Changes in the transcriptome in allograft rejection: IFN-gamma-induced transcripts in mouse kidney allografts. *Am J Transplant* 6, 1342-1354. [[PubMed](#)]
62. Desvaux D, Le Gouvello S, Pastural M, Abtahi M, Suberbielle C, Boeri N, Remy P, Salomon L, Lang P, Baron C, 2004. Acute renal allograft rejections with major interstitial oedema and plasma cell-rich infiltrates: high gamma-interferon expression and poor clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant* 19, 933-939. [[PubMed](#)]
63. Takei Y, Sims TN, Urmson J, Halloran PF, 2000. Central role for interferon-gamma receptor in the regulation of renal MHC expression. *J Am Soc Nephrol* 11, 250-261. [[PubMed](#)]
64. McLaughlin PJ, Aikawa A, Davies HM, Ward RG, Bakran A, Sells RA, Johnson PM, 1991. Evaluation of sequential plasma and urinary tumor necrosis factor alpha levels in renal allograft recipients. *Transplantation* 51, 1225-1229. [[PubMed](#)]
65. Heidenreich S, Lang D, Tepel M, Rahn KH, 1994. Monocyte activation for enhanced tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production during chronic renal allograft rejection. *Transpl Immunol* 2, 35-40. [[PubMed](#)]
66. Reinders ME, Sho M, Izawa A, Wang P, Mukhopadhyay D, Koss KE, Geehan CS, Luster AD, Sayegh MH, Briscoe DM, 2003. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J Clin Invest* 112, 1655-1665. [[PubMed](#)]

67. Luscinskas FW, Cybulsky MI, Kiely JM, Peckins CS, Davis VM, Gimbrone MA, Jr., 1991. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 146, 1617-1625. [[PubMed](#)]
68. Dorge SE, Roux-Lombard P, Dayer JM, Koch KM, Frei U, Lonnemann G, 1994. Plasma levels of tumor necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in kidney transplant recipients. *Transplantation* 58, 1000-1008. [[PubMed](#)]
69. Loverre A, Divella C, Castellano G, Tataranni T, Zaza G, Rossini M, Ditonno P, Battaglia M, Palazzo S, Gigante M, Ranieri E, Schena FP, Grandaliano G, 2011. T helper 1, 2 and 17 cell subsets in renal transplant patients with delayed graft function. *Transpl Int* 24, 233-242. [[PubMed](#)]
70. D'Ellos MM, Josien R, Manghetti M, Amedei A, de Carli M, Cuturi MC, Blancho G, Buzelin F, del Prete G, Soulillou JP, 1997. Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney Int* 51, 1876-1884. [[PubMed](#)]
71. Wang X, Xu X, Huang H, Cai M, Qian Y, Li Z, Bai H, Han Y, Xiao L, Zhou W, Chen M, Shi B, 2013. Interleukin-6 first plays pro- then anti-inflammatory role in early versus late acute renal allograft rejection. *Ann Clin Lab Sci* 43, 389-394. [[PubMed](#)]
72. Kutukculer N, Clark K, Rigg KM, Forsythe JL, Proud G, Taylor RM, Shenton BK, 1995. The value of posttransplant monitoring of interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, and soluble CD23 in the plasma of renal allograft recipients. *Transplantation* 59, 333-340. [[PubMed](#)]
73. Vandembroecke C, Caillat-Zucman S, Legendre C, Noel LH, Kreis H, Woodrow D, Bach JF, Tovey MG, 1991. Differential in situ expression of cytokines in renal allograft rejection. *Transplantation* 51, 602-609. [[PubMed](#)]
74. Waiser J, Budde K, Katalinic A, Kuerzdorfer M, Riess R, Neumayer HH, 1997. Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 12, 753-759. [[PubMed](#)]
75. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER, 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3725-3729. [[PubMed](#)]
76. Chang CH, Furue M, Tamaki K, 1994. Selective regulation of ICAM-1 and major histocompatibility complex class I and II molecule expression on epidermal Langerhans cells by some of the cytokines released by keratinocytes and T cells. *Eur J Immunol* 24, 2889-2895. [[PubMed](#)]
77. Daemen MA, van de Ven MW, Heineman E, Buurman WA, 1999. Involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 67, 792-800. [[PubMed](#)]
78. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, Carter CR, Davison A, Hernandez-Fuentes M, Hewitt E, Salama AD, Baker RJ, 2014. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF-alpha expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol* 25, 1575-1585. [[PubMed](#)]
79. Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ, 2004. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* 173, 7259-7268. [[PubMed](#)]
80. Monk NJ, Hargreaves RE, Simpson E, Dyson JP, Jurcevic S, 2006. Transplant tolerance: models, concepts and facts. *J Mol Med (Berl)* 84, 295-304. [[PubMed](#)]
81. Hu M, Wang C, Zhang GY, Saito M, Wang YM, Fernandez MA, Wang Y, Wu H, Hawthorne WJ, Jones C, O'Connell PJ, Sparwasser T, Bishop GA, Sharland AF, Alexander

- SI, 2013. Infiltrating Foxp3(+) regulatory T cells from spontaneously tolerant kidney allografts demonstrate donor-specific tolerance. *Am J Transplant* 13, 2819-2830. [[PubMed](#)]
82. Chung BH, Yang CW, Cho ML, 2018. Clinical significance of Th17 cells in kidney transplantation. *Korean J Intern Med.* [[PubMed](#)]
83. Hsieh HG, Loong CC, Lui WY, Chen A, Lin CY, 2001. IL-17 expression as a possible predictive parameter for subclinical renal allograft rejection. *Transpl Int* 14, 287-298. [[PubMed](#)]
84. Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S, Bruijn JA, De Fijter JW, Van Es LA, Daha MR, 1998. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 9, 1526-1534. [[PubMed](#)]
85. Healy DG, Watson RW, O'Keane C, Egan JJ, McCarthy JF, Hurley J, Fitzpatrick J, Wood AE, 2006. Neutrophil transendothelial migration potential predicts rejection severity in human cardiac transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 29, 760-766. [[PubMed](#)]
86. Zhao H, Alam A, Soo AP, George AJT, Ma D, 2018. Ischemia-Reperfusion Injury Reduces Long Term Renal Graft Survival: Mechanism and Beyond. *EBioMedicine* 28, 31-42. [[PubMed](#)]
87. Li WH, Sadler LA, 1991. Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129, 513-523. [[PubMed](#)]
88. Knight JC, 2003. Functional implications of genetic variation in non-coding DNA for disease susceptibility and gene regulation. *Clin Sci (Lond)* 104, 493-501. [[PubMed](#)]
89. Abraham LJ, Kroeger KM, 1999. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* 66, 562-566. [[PubMed](#)]
90. Lv K, Chen R, Cai Q, Fang M, Sun S, 2006. Effects of a single nucleotide polymorphism on the expression of human tumor necrosis factor-alpha. *Scand J Immunol* 64, 164-169. [[PubMed](#)]
91. Wramner LG, Norrby J, Hahn-Zoric M, Ahlmen J, Borjesson PA, Carlstrom J, Hytonen AM, Olausson M, Hanson LA, Padyukov L, 2004. Impaired kidney graft survival is associated with the TNF-alpha genotype. *Transplantation* 78, 117-121. [[PubMed](#)]
92. Brabcova I, Petrasek J, Hribova P, Hyklova K, Bartosova K, Lacha J, Viklicky O, 2007. Genetic variability of major inflammatory mediators has no impact on the outcome of kidney transplantation. *Transplantation* 84, 1037-1044. [[PubMed](#)]
93. Alakulppi NS, Kyllonen LE, Jantti VT, Matinlauri IH, Partanen J, Salmela KT, Laine JT, 2004. Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 78, 1422-1428. [[PubMed](#)]
94. Mytilineos J, Laux G, Opelz G, 2004. Relevance of IL10, TGFbeta1, TNFalpha, and IL4Ralpha gene polymorphisms in kidney transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 4, 1684-1690. [[PubMed](#)]
95. Thakkinstian A, Dmitrienko S, Gerbase-Delima M, McDaniel DO, Inigo P, Chow KM, McEvoy M, Ingsathit A, Trevillian P, Barber WH, Attia J, 2008. Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. *Nephrol Dial Transplant* 23, 3017-3023. [[PubMed](#)]
96. Hu X, Bai Y, Li S, Zeng K, Xu L, Liu Z, Song X, Lu X, Wang L, Ying B, 2011. Donor or recipient TNF-A -308G/A polymorphism and acute rejection of renal allograft: A meta-analysis. *Transpl Immunol* 25, 61-71. [[PubMed](#)]
97. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P, 1998. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription

and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102, 1369-1376. [[PubMed](#)]

98. Kocierz M, Siekiera U, Kolonko A, Karkoszka H, Chudek J, Cierpka L, Wiecek A, 2011. -174G/C interleukin-6 gene polymorphism and the risk of transplanted kidney failure or graft loss during a 5-year follow-up period. *Tissue Antigens* 77, 283-290. [[PubMed](#)]

99. Tajik N, Kazemi T, Delbandi A, Ghods A, Salek Moghaddam A, 2006. The Predictive Value of HLA-DR Matching and Cytokine Gene Polymorphisms in Renal Allograft Acute Rejection: a Living-unrelated Donor (LURD) Study. *Iran J Immunol* 3, 150-156. [[PubMed](#)]

100. Canossi A, Piazza A, Poggi E, Ozzella G, Di Rocco M, Papola F, Iaria G, Adorno D, 2007. Renal allograft immune response is influenced by patient and donor cytokine genotypes. *Transplant Proc* 39, 1805-1812. [[PubMed](#)]

101. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV, 2000. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 61, 863-866. [[PubMed](#)]

102. McDaniel DO, Barber WH, Nguyen C, Rhodes SW, May WL, McDaniel LS, Vig PJ, Jemeson LL, Butkus DE, 2003. Combined analysis of cytokine genotype polymorphism and the level of expression with allograft function in African-American renal transplant patients. *Transpl Immunol* 11, 107-119. [[PubMed](#)]

103. Tinckam K, Rush D, Hutchinson I, Dembinski I, Pravica V, Jeffery J, Nickerson P, 2005. The relative importance of cytokine gene polymorphisms in the development of early and late acute rejection and six-month renal allograft pathology. *Transplantation* 79, 836-841. [[PubMed](#)]

104. Zibar L, Wagner J, Pavlinic D, Galic J, Pasini J, Juras K, Barbic J, 2011. The relationship between interferon-gamma gene polymorphism and acute kidney allograft rejection. *Scand J Immunol* 73, 319-324. [[PubMed](#)]

105. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP, 2000. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 1, 185-190. [[PubMed](#)]

106. Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T, 2002. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors--a twin study. *Genes Immun* 3, 407-413. [[PubMed](#)]

107. Hutchings A, Guay-Woodford L, Thomas JM, Young CJ, Purcell WM, Pravica V, Perrey C, Hutchinson IV, Benfield MR, 2002. Association of cytokine single nucleotide polymorphisms with B7 costimulatory molecules in kidney allograft recipients. *Pediatr Transplant* 6, 69-77. [[PubMed](#)]

108. Oetting WS, Wu B, Schladt DP, Guan W, Rimmel RP, Dorr C, Mannon RB, Matas AJ, Israni AK, Jacobson PA, 2018. Attempted validation of 44 reported SNPs associated with tacrolimus troughs in a cohort of kidney allograft recipients. *Pharmacogenomics* 19, 175-184. [[PubMed](#)]

109. Pelletier R, Pravica V, Perrey C, Xia D, Ferguson RM, Hutchinson I, Orosz C, 2000. Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. *Transplantation* 70, 674-680. [[PubMed](#)]

110. Grinyo J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K, Rashford M, Nasmyth-Miller C, Voulgari A, Spleiss O, Truman M, Essioux L, 2008. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int* 21, 879-891. [[PubMed](#)]

111. Basu M, Das T, Ghosh A, Majumder S, Maji AK, Kanjilal SD, Mukhopadhyay I, Roychowdhury S, Banerjee S, Sengupta S, 2012. Gene-gene interaction and functional impact of polymorphisms on innate immune genes in controlling Plasmodium falciparum blood infection level. PLoS One 7, e46441. [[PubMed](#)]
112. Yilmaz V, Yentur SP, Saruhan-Direskeneli G, 2005. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. Cytokine 30, 188-194. [[PubMed](#)]
113. Seegers D, Zwieters A, Strober W, Pena AS, Bouma G, 2002. A TaqI polymorphism in the 3'UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. Genes Immun 3, 419-423. [[PubMed](#)]
114. Stanilova S, Miteva L, 2005. Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. Genes Immun 6, 364-366. [[PubMed](#)]
115. Morahan G, Huang D, Ymer SI, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, Werther G, Tait BD, Harrison LC, Colman PG, 2001. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. Nat Genet 27, 218-221. [[PubMed](#)]
116. Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Messina M, Pratico L, Rendine S, Segoloni G, Curtoni ES, 2004. Cytokines and chronic rejection: a study in kidney transplant long-term survivors. Transplantation 77, 548-552. [[PubMed](#)]
117. Chin GK, Adams CL, Carey BS, Shaw S, Tse WY, Kaminski ER, 2008. The value of serum neopterin, interferon-gamma levels and interleukin-12B polymorphisms in predicting acute renal allograft rejection. Clin Exp Immunol 152, 239-244. [[PubMed](#)]
118. Khan F, Sar A, Gonul I, Benediktsson H, Doulla J, Yilmaz S, Berka N, 2010. Graft inflammation and histologic indicators of kidney chronic allograft failure: low-expressing interleukin-10 genotypes cannot be ignored. Transplantation 90, 630-638. [[PubMed](#)]
119. Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Al-Najjar A, Marliere JF, Lebranchu Y, Baron C, 2009. Impact of a polymorphism in the IL-12p40 gene on the outcome of kidney transplantation. Transplant Proc 41, 654-656. [[PubMed](#)]
120. Kahan BD, 1996. Pharmacokinetic considerations in the therapeutic application of cyclosporine in renal transplantation. Transplant Proc 28, 2143-2146. [[PubMed](#)]
121. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ, 1992. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 3686-3690. [[PubMed](#)]
122. Lemaire M, Tillement JP, 1982. Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. J Pharm Pharmacol 34, 715-718. [[PubMed](#)]
123. Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Tokuma Y, Hata T, Fujii Y, Sakuma S, Fujitsu T, Fujikawa A, et al., 1995. Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. Drug Metab Dispos 23, 28-34. [[PubMed](#)]
124. Allison AC, Eugui EM, 2005. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. Transplantation 80, S181-190. [[PubMed](#)]
125. Lee WA, Gu L, Miksztal AR, Chu N, Leung K, Nelson PH, 1990. Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization. Pharm Res 7, 161-166. [[PubMed](#)]
126. Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le Meur Y, Marquet P, 2005. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. Drug Metab Dispos 33, 139-146. [[PubMed](#)]

2010. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 87, 100-108. [[PubMed](#)]
128. Patel CG, Ogasawara K, Akhlaghi F, 2013. Mycophenolic acid glucuronide is transported by multidrug resistance-associated protein 2 and this transport is not inhibited by cyclosporine, tacrolimus or sirolimus. *Xenobiotica* 43, 229-235. [[PubMed](#)]
129. Sharif A, Baboolal K, 2011. Complications associated with new-onset diabetes after kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol* 8, 34-42. [[PubMed](#)]
130. Neale J, Smith AC, 2015. Cardiovascular risk factors following renal transplant. *World J Transplant* 5, 183-195. [[PubMed](#)]
131. Bonvoisin C, Weekers L, Xhignesse P, Grosch S, Milicevic M, Krzesinski JM, 2008. Polyomavirus in renal transplantation: a hot problem. *Transplantation* 85, S42-48. [[PubMed](#)]
132. Rendic S, 2002. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 34, 83-448. [[PubMed](#)]
133. Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmoller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U, Wojnowski L, 2002. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* 30, 1108-1114. [[PubMed](#)]
134. Kamdem LK, Streit F, Zanger UM, Brockmoller J, Oellerich M, Armstrong VW, Wojnowski L, 2005. Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem* 51, 1374-1381. [[PubMed](#)]
135. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, Thummel KE, 2006. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos* 34, 836-847. [[PubMed](#)]
136. Ho RH, Kim RB, 2005. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 78, 260-277. [[PubMed](#)]
137. Michelon H, Konig J, Durrbach A, Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Ferlicot S, Letierce A, Charpentier B, Fromm MF, Becquemont L, 2010. SLC01B1 genetic polymorphism influences mycophenolic acid tolerance in renal transplant recipients. *Pharmacogenomics* 11, 1703-1713. [[PubMed](#)]
138. Jain J, Almquist SJ, Ford PJ, Shlyakhter D, Wang Y, Nimmesgern E, Germann UA, 2004. Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 67, 767-776. [[PubMed](#)]
139. Shaw LM, Korecka M, Venkataramanan R, Goldberg L, Bloom R, Brayman KL, 2003. Mycophenolic acid pharmacodynamics and pharmacokinetics provide a basis for rational monitoring strategies. *Am J Transplant* 3, 534-542. [[PubMed](#)]
140. van Gelder T, Hilbrands LB, Vanrenterghem Y, Weimar W, de Fijter JW, Squifflet JP, Hene RJ, Verpooten GA, Navarro MT, Hale MD, Nicholls AJ, 1999. A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 68, 261-266. [[PubMed](#)]
141. Chiarelli LR, Molinaro M, Libetta C, Tinelli C, Cosmai L, Valentini G, Dal Canton A, Regazzi M, 2010. Inosine monophosphate dehydrogenase variability in renal transplant patients on long-term mycophenolate mofetil therapy. *Br J Clin Pharmacol* 69, 38-50. [[PubMed](#)]
142. Winnicki W, Weigel G, Sunder-Plassmann G, Bajari T, Winter B, Herkner H, Sengoelge G, 2010. An inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 single-nucleotide

polymorphism impairs the effect of mycophenolic acid. *Pharmacogenomics J* 10, 70-76. [[PubMed](#)]

143. Sombogaard F, van Schaik RH, Mathot RA, Budde K, van der Werf M, Vulto AG, Weimar W, Glander P, Essioux L, van Gelder T, 2009. Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics* 19, 626-634. [[PubMed](#)]

144. Wu TY, Peng Y, Pelleymounter LL, Moon I, Eckloff BW, Wieben ED, Yee VC, Weinshilboum RM, 2010. Pharmacogenetics of the mycophenolic acid targets inosine monophosphate dehydrogenases IMPDH1 and IMPDH2: gene sequence variation and functional genomics. *Br J Pharmacol* 161, 1584-1598. [[PubMed](#)]

145. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y, 2007. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther* 82, 711-725. [[PubMed](#)]

146. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR, 2004. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 5, 243-272. [[PubMed](#)]

147. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW, 2004. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 4, 914-919. [[PubMed](#)]

148. Min SI, Kim SY, Ahn SH, Min SK, Kim SH, Kim YS, Moon KC, Oh JM, Kim SJ, Ha J, 2010. CYP3A5 *1 allele: impacts on early acute rejection and graft function in tacrolimus-based renal transplant recipients. *Transplantation* 90, 1394-1400. [[PubMed](#)]

149. Gensburger O, Van Schaik RH, Picard N, Le Meur Y, Rousseau A, Woillard JB, Van Gelder T, Marquet P, 2010. Polymorphisms in type I and II inosine monophosphate dehydrogenase genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil. *Pharmacogenet Genomics* 20, 537-543. [[PubMed](#)]

150. Wang J, Yang JW, Zeevi A, Webber SA, Girnita DM, Selby R, Fu J, Shah T, Pravica V, Hutchinson IV, Burckart GJ, 2008. IMPDH1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 83, 711-717. [[PubMed](#)]

151. Shah S, Harwood SM, Dohler B, Opelz G, Yaqoob MM, 2012. Inosine monophosphate dehydrogenase polymorphisms and renal allograft outcome. *Transplantation* 94, 486-491. [[PubMed](#)]

152. Oshiro C, Mangravite L, Klein T, Altman R, 2010. PharmGKB very important pharmacogene: SLC01B1. *Pharmacogenet Genomics* 20, 211-216. [[PubMed](#)]

153. Popadic S, Savic E, Markovic M, Ramic Z, Medenica L, Pravica V, Spuran Z, Trajkovic V, Popadic D, 2015. TNF, IL12B, and IFNG Gene Polymorphisms in Serbian Patients with Psoriasis. *Ann Dermatol* 27, 128-132. [[PubMed](#)]

154. Perovic D, Perovic V, Pravica V, Bonaci-Nikolic B, Mijanovic R, Bunjevacki V, 2016. Evaluation of cytokine genetic polymorphisms in adult patients with common variable immunodeficiency: A single-center study. *Immunol Lett* 176, 97-104. [[PubMed](#)]

155. Excoffier L, Lischer HE, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10, 564-567. [[PubMed](#)]

156. Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Montano RF, 2006. Risk of adverse post-transplant events after kidney allograft transplantation as predicted by CTLA-4 +49 and TNF-alpha -308 single nucleotide polymorphisms: a preliminary study. *Transpl Immunol* 16, 194-199. [[PubMed](#)]

157. Park JY, Park MH, Park H, Ha J, Kim SJ, Ahn C, 2004. TNF-alpha and TGF-beta1 gene polymorphisms and renal allograft rejection in Koreans. *Tissue Antigens* 64, 660-666. [[PubMed](#)]
158. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Florczak M, Dabrowska-Zamojcin E, Dutkiewicz G, Gawronska-Szklarz B, 2005. IL-2 and TNF-alpha promoter polymorphisms in patients with acute kidney graft rejection. *Transplant Proc* 37, 2041-2043. [[PubMed](#)]
159. Marshall SE, McLaren AJ, Haldar NA, Bunce M, Morris PJ, Welsh KI, 2000. The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 70, 1485-1491. [[PubMed](#)]
160. Krajewska M, Koscielska-Kasprzak K, Weyde W, Drulis-Fajdasz D, Madziarska K, Mazanowska O, Kuzstal M, Klingler M, 2009. Recipient genetic determinants of inflammatory process and nonstandard atherosclerosis risk factors affect kidney graft function early posttransplantation. *Transplant Proc* 41, 3060-3062. [[PubMed](#)]
161. La Manna G, Cappuccilli ML, Capelli I, Baraldi O, Cuna V, Battaglino G, Feliciangeli G, Dormi A, Scolari MP, Stefoni S, 2013. The impact of apoptosis and inflammation gene polymorphisms on transplanted kidney function. *Ann Transplant* 18, 256-264. [[PubMed](#)]
162. Popadic D, Savic E, Spuran Z, Markovic M, Mostarica Stojkovic M, Ramic Z, Pravica V, 2012. Distinctive frequencies of +874T/A IFN-gamma gene polymorphism in a healthy Serbian population. *Clin Transl Sci* 5, 461-463. [[PubMed](#)]
163. Omrani MD, Mokhtari MR, Bagheri M, Ahmadpoor P, 2010. Association of interleukin-10, interferon-gamma, transforming growth factor-beta, and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with long-term kidney allograft survival. *Iran J Kidney Dis* 4, 141-146. [[PubMed](#)]
164. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV, 1997. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 24, 1-8. [[PubMed](#)]
165. Mendoza-Carrera F, Ojeda-Duran S, Angulo E, Rivas F, Macias-Lopez G, Buen EP, Leal C, 2008. Influence of cytokine and intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms on acute rejection in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant* 12, 755-761. [[PubMed](#)]
166. Kagaya H, Miura M, Saito M, Habuchi T, Satoh S, 2010. Correlation of IMPDH1 gene polymorphisms with subclinical acute rejection and mycophenolic acid exposure parameters on day 28 after renal transplantation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 107, 631-636. [[PubMed](#)]
167. Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH, Weimar W, van der Heiden IP, de Fijter JW, Kuypers DR, van Gelder T, 2012. Mycophenolic acid-related diarrhea is not associated with polymorphisms in SLC01B1 nor with ABCB1 in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 22, 399-407. [[PubMed](#)]
168. Alves C, Felipe CR, Nishikawa AM, Salgado PC, Fajardo C, 2014. Influence of SLC01B1 and SLC02B1 Polymorphisms on Tacrolimus Pharmacokinetics and Clinical Response. *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics* 5. [[PubMed](#)]
169. Liu JY, You RX, Guo M, Zeng L, Zhou P, Zhu L, Xu G, Li J, Liu D, 2016. Tacrolimus Versus Cyclosporine as Primary Immunosuppressant After Renal Transplantation: A Meta-Analysis and Economics Evaluation. *Am J Ther* 23, e810-824. [[PubMed](#)]
170. Chaumont M, Racape J, Broeders N, El Mountahi F, Massart A, Baudoux T, Hougardy JM, Mikhalsky D, Hamade A, Le Moine A, Abramowicz D, Vereerstraeten P, 2015. Delayed Graft Function in Kidney Transplants: Time Evolution, Role of Acute Rejection, Risk Factors, and Impact on Patient and Graft Outcome. *J Transplant* 2015, 163757. [[PubMed](#)]

171. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL, 1997. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 63, 968-974. [[PubMed](#)]
172. Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ, Owen AB, Brennan DC, Bailly JE, Schnitzler MA, 2003. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 14, 2967-2974. [[PubMed](#)]
173. Poli F, Boschiero L, Giannoni F, Tonini M, Scalamogna M, Ancona G, Sirchia G, 2000. Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism: implications in kidney transplantation. *Cytokine* 12, 1778-1783. [[PubMed](#)]
174. Pawlus J, Sierocka A, Tejchman K, Zietek Z, Romanowski M, Pawlik A, Sienko J, Zukowski M, Ciechanowski K, Ostrowski M, Sulikowski T, 2014. The impact of interleukin 12B (1188A>C), interleukin 16 (-295T>C), and interleukin 18 (607C>A, 137G>C) gene polymorphisms on long-term renal transplant function and recipient outcomes. *Transplant Proc* 46, 2079-2082. [[PubMed](#)]
175. Boca AN, Talamonti M, Galluzzo M, Botti E, Vesa SC, Chimenti S, Buzoianu AD, Costanzo A, 2013. Genetic variations in IL6 and IL12B decreasing the risk for psoriasis. *Immunol Lett* 156, 127-131. [[PubMed](#)]
176. Kaarvatn MH, Vrbanec J, Kulic A, Knezevic J, Petricevic B, Balen S, Vrbanec D, Dembic Z, 2012. Single nucleotide polymorphism in the interleukin 12B gene is associated with risk for breast cancer development. *Scand J Immunol* 76, 329-335. [[PubMed](#)]
177. Trinchieri G, 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146. [[PubMed](#)]
178. McGeachy MJ, Cua DJ, 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28, 445-453. [[PubMed](#)]
179. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC, 2011. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* 11, 2279-2296. [[PubMed](#)]
180. Abadja F, Sarraj B, Ansari MJ, 2012. Significance of T helper 17 immunity in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 17, 8-14. [[PubMed](#)]
181. de Mattos AM, Meyer MM, Norman DJ, Bennett WM, Sprague J, Bakke AC, 1997. Interleukin-12 p40 m-RNA expression in human kidney allograft biopsies. *Transpl Immunol* 5, 199-203. [[PubMed](#)]
182. Malyszko J, Lukaszuk E, Glowinska I, Durluk M, 2015. Biomarkers of delayed graft function as a form of acute kidney injury in kidney transplantation. *Sci Rep* 5, 11684. [[PubMed](#)]
183. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H, 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19, 423-474. [[PubMed](#)]
184. Cooper AM, Khader SA, 2007. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol* 28, 33-38. [[PubMed](#)]
185. Egwuagu CE, Yu CR, Sun L, Wang R, 2015. Interleukin 35: Critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 26, 587-593. [[PubMed](#)]
186. Guo H, Wang W, Zhao N, He X, Zhu L, Jiang X, 2013. Inhibiting cardiac allograft rejection with interleukin-35 therapy combined with decitabine treatment in mice. *Transpl Immunol* 29, 99-104. [[PubMed](#)]
187. Zhang XH, Zhou Y, Zhang JM, Zhou SY, Wang M, Feng R, Feng FE, Wang QM, Zhu XL, Zhao XS, Lv M, Kong Y, Chang YJ, Huang XJ, 2015. IL-35 inhibits acute graft-versus-host disease in a mouse model. *Int Immunopharmacol* 29, 383-392. [[PubMed](#)]

188. Hu L, Chen C, Zhang J, Wu K, Zhang X, Liu H, Hou J, 2017. IL-35 Pretreatment Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury in Mice by Inhibiting NF-kappaB Activation. *Inflammation* 40, 1393-1400. [[PubMed](#)]
189. Reviron D, Dussol B, Andre M, Brunet P, Mercier P, Berland Y, 2001. TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. *Transplant Proc* 33, 350-351. [[PubMed](#)]
190. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, Sinnott PJ, Hutchinson IV, 1999. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int* 56, 281-288. [[PubMed](#)]
191. Sanchez-Fructuoso AI, Perez-Flores I, Valero R, Moreno MA, Fernandez-Arquero M, Urcelay E, Fernandez-Perez C, Santiago JL, 2016. The Polymorphism -308G/A of Tumor Necrosis Factor-alpha Gene Modulates the Effect of Immunosuppressive Treatment in First Kidney Transplant Subjects Who Suffer an Acute Rejection. *J Immunol Res* 2016, 2197595. [[PubMed](#)]
192. Stojanova J, Pouche L, Picard N, 2016. Genetic polymorphisms in the immune response: A focus on kidney transplantation. *Clin Biochem* 49, 363-376. [[PubMed](#)]
193. Breulmann B, Bantis C, Siekierka M, Blume C, Aker S, Kuhr N, Grabensee B, Ivens K, 2007. Influence of cytokine genes polymorphisms on long-term outcome in renal transplantation. *Clin Transplant* 21, 615-621. [[PubMed](#)]
194. Hahn AB, Kasten-Jolly JC, Constantino DM, Graffunder E, Singh TP, Shen GK, Conti DJ, 2001. TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma, and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. *Transplantation* 72, 660-665. [[PubMed](#)]
195. Dhaouadi T, Sfar I, Bardi R, Jendoubi-Ayed S, Abdallah TB, Ayed K, Gorgi Y, 2013. Cytokine gene polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc* 45, 2152-2157. [[PubMed](#)]
196. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW, 1993. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 177, 557-560. [[PubMed](#)]
197. Berber I, Yigit B, Isitmangil G, Tellioglu G, Ozgezer T, Gulle S, Turkmen F, Titiz I, 2008. Evaluation of pretransplant serum cytokine levels in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 40, 92-93. [[PubMed](#)]
198. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW, 1994. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83, 113-118. [[PubMed](#)]
199. Muller-Steinhardt M, Hartel C, Muller B, Kirchner H, Fricke L, 2002. The interleukin-6 -174promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int* 62, 1824-1827. [[PubMed](#)]
200. Raasveld MH, Bloemena E, Wilmink JM, Surachno S, Schellekens PT, ten Berge RJ, 1993. Interleukin-6 and neopterin in renal transplant recipients: a longitudinal study. *Transpl Int* 6, 89-94. [[PubMed](#)]
201. Terry CF, Loukaci V, Green FR, 2000. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 275, 18138-18144. [[PubMed](#)]
202. Amirzargar A, Lessanpezeshki M, Fathi A, Amirzargar M, Khosravi F, Ansari-pour B, Nikbin B, 2005. TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients. *Transplant Proc* 37, 2985-2987. [[PubMed](#)]
203. Karczewski J, Karczewski M, Wiktorowicz K, 2010. Pretransplant urine cytokine pattern predicts acute kidney rejection. *Cytokine* 51, 10-11. [[PubMed](#)]

204. Ge YZ, Wu R, Jia RP, Liu H, Yu P, Zhao Y, Feng YM, 2013. Association between interferon gamma +874 T>A polymorphism and acute renal allograft rejection: evidence from published studies. *Mol Biol Rep* 40, 6043-6051. [[PubMed](#)]
205. Misra MK, Pandey SK, Kapoor R, Sharma RK, Kapoor R, Prakash S, Agrawal S, 2014. HLA-G gene expression influenced at allelic level in association with end stage renal disease and acute allograft rejection. *Hum Immunol* 75, 833-839. [[PubMed](#)]
206. Ho AS, Moore KW, 1994. Interleukin-10 and its receptor. *Ther Immunol* 1, 173-185. [[PubMed](#)]
207. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C, 2003. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 75, 711-717. [[PubMed](#)]
208. Mijac D, Petrovic IV, Djuranovic S, Perovic V, Bojic D, Culafic D, Popovic D, Krstic M, Jankovic G, Djoric M, Pravica V, Markovic M, 2016. The polymorphism rs3024505 (C/T) downstream of the IL10 gene is associated with crohn's disease in serbian patients with inflammatory bowel disease. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 240, 15-24. [[PubMed](#)]
209. Scarpelli D, Cardellini M, Andreozzi F, Laratta E, Hribal ML, Marini MA, Tassi V, Lauro R, Perticone F, Sesti G, 2006. Variants of the interleukin-10 promoter gene are associated with obesity and insulin resistance but not type 2 diabetes in caucasian italian subjects. *Diabetes* 55, 1529-1533. [[PubMed](#)]
210. Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P, Cimino L, Bajocchi G, Catanoso MG, Pattacini L, Salvarani C, 2006. Interleukin-10 promoter polymorphisms in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 54, 4011-4017. [[PubMed](#)]
211. Eskdale J, Keijsers V, Huizinga T, Gallagher G, 1999. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun* 1, 151-155. [[PubMed](#)]
212. Hu Q, Tian H, Wu Q, Li J, Cheng X, Liao P, 2016. Interleukin-10-1082 G/a polymorphism and acute renal graft rejection: a meta-analysis. *Ren Fail* 38, 57-64. [[PubMed](#)]
213. George S, Turner D, Reynard M, Navarrete C, Rizvi I, Fernando ON, Powis SH, Moorhead JF, Varghese Z, 2001. Significance of cytokine gene polymorphism in renal transplantation. *Transplant Proc* 33, 483-484. [[PubMed](#)]
214. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J, 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1890-1893. [[PubMed](#)]
215. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB, 1997. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 695-700. [[PubMed](#)]
216. Hueso M, Navarro E, Moreso F, O'Valle F, Perez-Riba M, Del Moral RG, Grinyo JM, Seron D, 2010. Intra-graft expression of the IL-10 gene is up-regulated in renal protocol biopsies with early interstitial fibrosis, tubular atrophy, and subclinical rejection. *Am J Pathol* 176, 1696-1704. [[PubMed](#)]
217. Schiff J, Cole E, Cantarovich M, 2007. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 374-384. [[PubMed](#)]
218. van Gelder T, Hesselink DA, 2015. Mycophenolate revisited. *Transpl Int* 28, 508-515. [[PubMed](#)]
219. Macphee IA, 2010. Use of pharmacogenetics to optimize immunosuppressive therapy. *Ther Drug Monit* 32, 261-264. [[PubMed](#)]

220. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, Suzuki T, Habuchi T, Kato T, 2004. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 78, 1182-1187. [[PubMed](#)]
221. van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J, 2002. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem* 48, 1668-1671. [[PubMed](#)]
222. Stefanovic N, Cvetkovic T, Veličkovic-Radovanović R, Jevtovic-Stoimenov T, Stojanovic D, Zivkovic N, 2013. Significance of CYP3A5 gene polymorphism in Serbian renal transplant patients. *Acta medica medianae* 52, 33-38.
223. Dragas Milovanovic D, Radosavljevic I, Radovanovic M, Milovanovic J, Obradovic S, Jankovic S, Milovanovic D, Djordjevic N, 2015. CYP3A5 polymorphism in serbian paediatric epileptic patients on carbamazepine treatment. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 16, 93-99.
224. Iwai M, Suzuki H, Ieiri I, Otsubo K, Sugiyama Y, 2004. Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C). *Pharmacogenetics* 14, 749-757. [[PubMed](#)]
225. Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ, 2011. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* 63, 157-181. [[PubMed](#)]
226. Amundsen R, Christensen H, Zabihyan B, Asberg A, 2010. Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 38, 1499-1504. [[PubMed](#)]

Spisak skraćenica

AO – akutno odbacivanje

ATP - adenzin-trifosfat

Breg – regulatorne B-ćelije

CD - (*engl.* Cluster of Differentiation), diferencijacijska grupa

CSF-1 – (*engl.* colony stimulating factor-1), faktor stimulacije kolonija

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

DGF - (*engl.* delayed graft function), odložena funkcija kalema

EDTA - (*engl.* Ethylenediaminetetraacetic acid), etilen diamin tetrasirćetna kiselina

EM- (*engl.* Estimation Maximization), maksimizacija očekivanja

FAM- fluorescentna boja neobjavljene stukture, patent Applied Biosystems

HLA- humani leukocitni antigen

HEK – (*engl.* human embryonic kidney cells), humane embrionalne ćelije bubrega

ICAM-1 - (*engl.* intercellular adhesion molecul-1), intercelularni adhezivni molekul-1

IFN – interferon

IgA – imunoglobulin klase A

IL-1beta – interleukin-1 beta

IL-2 – interleukin-2

IL-4 – interleukin-4

IL-6 - interleukin-6

IL-10 - interleukin-10

IL-12 – interleukin-12

IL-15 – interleukin-15

IL-17 – interleukin-17

IL-18 – Interlukin-18

IMPDH1 – (*engl.* inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1), inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza 1

IP 95% - interval poverenja od 95%

iRNK -informaciona RNK

LD - (*engl.* Linkage Disequilibrium), neravnoteža vezanosti

mTOR-a – (*engl.* mammalian target of rapamycin), meta rapamicina kod kičmenjaka

MFK – mikofenolična kiselina

NFAT – (*engl.* nuclear factor of activated T-cells), nuklearni faktor aktiviranih T-ćelija

OATP - (*engl.* organic anion transporter polypeptide), polipeptidni transporter organskih anjona

OATP1B1 - (*engl.* organic anion transporter polypeptide 1B1), transporter organskih anjona polipeptid 1B1

PCR - polimerazna reakcija lančanog umnožavanja

PCR-RFLP - (*engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism), polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcionom digestijom

PCR-SSP - PCR sa specifičnim prajmerom za sekvencu

ROA - reaktivni oblici azota

RNK - ribonukleinska kiselina

ROK – reaktivni oblici kiseonika

SAD - Sjedinjene Američke Države

SLCO1B1 - (*engl.* solute carrier organic anion transporter family member 1B1), solubilni transporter organskih anjona familije 1B1

SNP - (*engl.* Single Nucleotide Polymorphism), polimorfizmi pojedinačnih nukleotida

Th - (*engl.* T helper), pomoćnički T-limfociti

TNF - (*engl.* Tumor Necrosis Factor), faktor nekroze tumora

TGF – (*engl.* transforming growth factor), faktor transformacije rasta

Treg – regulatorne T-ćelije

VEGF - (*engl.* vascular endothelial growth factor), faktor rasta vaskularnog endotela

VIC - fluorescentna boja neobjavljene strukture, patent Applied Biosystems

WB - (*engl.* Wash Buffer), pufer za ispiranje

Biografija

Dr Vladimir Perović je rođen 21.11.1975. godine u Beogradu. Na Medicinskom fakultetu u Beogradu diplomirao je 2001. godine sa prosečnom ocenom 9,11. Specijalistički ispit iz Imunologije položio je sa odličnom ocenom 2013. godine na Medicinskom Fakultetu u Beogradu. U periodu od 2002.-2005. godine bio je zaposlen kao asistent pripravnik na Institutu za humanu genetiku, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Stručno usavršavanje (postdoctoral fellow) iz imunologije i genetike (2005-2009. godine) obavio je na Univerzitetu Johns Hopkins u Baltimoru, SAD. U toku stručnog usavršavanja radio je na projektu identifikacije T-ćelijskih epitopa virusa besnila, koji bi bili potencijalno značajni za pravljenje savremene i bezbedne vakcine. Dalje usavršavanje nastavio je u drugoj laboratoriji na istom Univerzitetu, gde je fokus istraživanja bio usmeren na proučavanje imunskog odgovora na infekciju parazitom *Leishmania donovani*. U periodu od 2009.-2013. godine, Dr Vladimir Perović je bio zaposlen u Laboratoriji za protočnu citometriju i imunologiju, Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić". U laboratoriji je bio angažovan na poslovima koji su obuhvatali rutinske imunološke metode kao i visoko specijalizovane metode određivanja imunofenotipa akutnih leukemija dečjeg doba i procena minimalne rezidualne bolesti kod dece obolele od akutne limfoblastne metodom protočne citofluorimetrije. Zaposlen je na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu gde je izabran u zvanje asistenta 2013. godine odnosno reizabran u isto zvanje 2015. godine. Bio je saradnik na nekoliko projekata Ministarstvo nauke i tehnološkog razvoja Srbije i nekoliko međunarodnih projekata. Prva oblast naučnog interesovanja bila je proučavanje imunskog odgovora na viruse i parazite, a u daljem naučno istraživačkom radu bavi se ispitivanjem genetičkih markera u transplantaciji bubrega, inflamatornim bolestima i primarnim imunodeficijencijama. Do sada je objavio 12 radova u časopisima sa JCR liste.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisan: **Vladimir Perović**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Ispitivanje značaja polimorfizama gena za citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport imunosupresivnih lekova u akutnom odbacivanju transplantiranog bubrega“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 10. 07. 2018. godine

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Potpisan: **Vladimir Perović**

Naslov rada, „**Ispitivanje značaja polimorfizama gena za citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport imunosupresivnih lekova u akutnom odbacivanju transplantiranog bubrega**“

Mentor: **Prof. dr Vera Pravica**

Komentor: **Prof. dr Radomir Naumović**

Potpisani Vladimir Perović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 10. 07. 2018. godine

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ispitivanje značaja polimorfizama gena za citokine i proteine koji regulišu metabolizam i transport imunosupresivnih lekova u akutnom odbacivanju transplantiranog bubrega“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda



U Beogradu, 10. 07. 2018. godine