



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET
INSTITUT ZA PATOFIZIOLOGIJU



DIJANA STOJANOVIĆ

**KLINIČKO-BIOHEMIJSKI
POKAZATELJI ENDOTELNE
DISFUNKCIJE I INFLAMACIJE KOD
PACIJENATA SA TRANSPLANTIRANIM
BUBREGOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor

PROF. DR VLADMILA BOJANIĆ

Niš, 2014. godine



UNIVERSITY OF NIS
FACULTY OF MEDICINE
INSTITUTE OF PATHOPHYSIOLOGY



DIJANA STOJANOVIĆ

**CLINICAL AND BIOCHEMICAL
ASSESSMENT OF ENDOTHELIAL
DYSFUNCTION AND INFLAMMATION
IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS**

PhD DISSERTATION

Mentor

PROF. DR VLADMILA BOJANIĆ

Niš, 2014.

Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Tatjana Cvetković—predsednik komisije

Institut za biohemiju, Medicinski fakultet u Nišu,
Klinika za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Klinički centar u Nišu

Prof. dr Vladmila Bojanić—mentor i član

Institut za patofiziologiju, Medicinski fakultet u Nišu

Prof. dr Sonja Radenković—član

Institut za patofiziologiju, Medicinski fakultet u Nišu,
Klinika za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Klinički centar u Nišu

Prof. dr Gordana Kocić—član

Institut za biohemiju, Medicinski fakultet u Nišu

Prof. dr Snežana Živančević Simonović, član sa Medicinskog fakulteta u Kragujevcu

Institut za patofiziologiju, Medicinski fakultet u Kragujevcu

Datum odbrane: _____

Zahvalnost

Iako doktorsku disertaciju potpisuje pojedinac, ona predstavlja sublimaciju rada velikog broja ljudi. Kao naučno delo, doktorska teza spaja iskustvo, znanje i mudrost profesora sa naučnom radoznalošću i entuzijazmom doktoranata. Dužnost doktoranta, nakon toga, je da u svemu nadvisi svoje učitelje, da ne bi zauvek ostao učenik.....

Iz tog razloga se ovom prilikom zahvaljujem svojim učiteljima, kao i svima koji su mi na neki način pomogli u izradi disertacije.

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorki, prof. dr Vladmili Bojanić za nesebičnu pomoć, podršku i prijateljstvo, ne samo tokom izrade disertacije, kao i na ukazanom poverenju tokom svih godina zajedničkog rada.

Posebno sam zahvalna predsednici Komisije, prof. dr Tatjani Cvetković na svesrdnom ulaganju znanja, vremena i energije tokom čitave izrade doktorata, počevši od laboratorijskog dela, preko sređivanja i tumačenja rezultata, do uobličavanja i pisanja disertacije.

Takođe se vrlo iskreno zahvaljujem prof. dr Sonji Radenković, na njenom principijelnom stavu, na svim korisnim sugestijama tokom pisanja, kao i na druženju tokom detaljnog iščitavanja disertacije.

Posebno se zahvaljujem prodekanici, prof. dr Gordani Kocić, za koju me vezuje jedan poseban odnos. Zahvaljujem joj se na bezuslovnoj veri i bezrezervnoj podršci, na svim savetima i potpunom poverenju.

Koristim priliku da se zahvalim i prof. dr Snežani Živančević Simonović, sa Fakulteta medicinskih nauka iz Kragujevca, na saradnji i učešću u oceni ove disertacije.

Zahvaljujem se svojim kolegama, svim profesorima i asistentima sa predmeta Patofiziologija, Medicinskog fakulteta u Nišu, koji su me podržali i motivisali da istrajem u pisanju disertacije.

Takođe se zahvaljujem asistentu Nikoli Stefanoviću, sa Katedre za farmaciju, Medicinskog fakulteta u Nišu, za kvalitetan zajednički rad tokom izrade disertacije.

Zahvalnost dugujem i kolegama sa Instituta za biohemiju, pre svega prof. dr Dušici Pavlović, za finansijsku pomoć pri nabavci reagenasa i prof. dr Stevi Najmanu, sa Instituta za medicinsku genetiku, sa kojima sam kvalitetno i uspešno sarađivala mnogo pre izrade ove disertacije.

Takođe se zahvaljujem lekarima, doc. dr Branki Mitić i prim. dr Goranu Paunoviću, iz transplantacionog tima Klinike za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, na savetima i pomoći pri odabiru pacijenata. Veliku zahvalnost dugujem i svim sestrama i tehničarima iz Biohemijske laboratorije Klinike za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, koji su pokazali visok stepen razumevanja i svesrdno mi pomogli u laboratorijskom radu.

Zahvaljujem se svome mužu, doc. dr Miodragu Stojanoviću, za modernu i preciznu statističku obradu i za svo razumevanje, ljubav, podršku, savete, veru i trpljenje mnogo godina unazad...

Zahvaljujem se svojim kumovima i prijateljima, što su mi bliskošću i prijateljstvom pomogli da prevazidjem „nepremostive“ trenutke, kada se činilo da rešenja ne postoje.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, bratu i bratanicama, Vanji i Jeleni, što su me bezrezervno i bezuslovno podržavali i voleli, čak u trenucima kada to nisam zasluživala.

U Nišu, aprila 2014. godine

Autor

Tabla i polja mi ne govore ništa, ljudi su moji učitelji

Platon

Mojim roditeljima

I Autor

Ime i prezime	Dijana Stojanović
Datum i mesto rođenja:	Niš, 4.08.1976.
Sadašnje zaposlenje:	Asistent na UNO Patofiziologija

II Doktorska disertacija

Naslov:	Kliničko-biohemijski pokazatelji endotelne disfunkcije i inflamacije kod pacijenata sa transplantiranim bubregom
Broj stranica:	124
Broj šema/slika:	4
Broj tabela:	21
Broj grafikona:	5
Broj bibliografskih podataka:	342
Ustanova i mesto gde je rad izrađen:	Institut za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu Klinika za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Kliničkog centra u Nišu
Naučna oblast:	UNO Patofiziologija
Mentor:	Prof. dr Vladmila Bojanić

III Ocena i odbrana

Datum prijave teme:	19.03.2013.
Datum prihvatanja doktorske disertacije:	27.11.2013.
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata:	Prof. dr Tatjana Cvetković–predsednik Prof. dr Vladmila Bojanić–mentor i član Prof. dr Sonja Radenković–član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:	Prof. dr Tatjana Cvetković–predsednik Prof. dr Vladmila Bojanić–mentor i član Prof. dr Sonja Radenković–član Prof. dr Gordana Kocić–član Prof. dr Snežana Živančević Simonović, član
Datum odbrane doktorske disertacije:	

IV Naučni doprinos doktorske disertacije

Stojanovic D, Cvetkovic T, Stojanovic M, Bojanic V, Stefanovic N, Radenkovic S, Ljubisavljevic S, Pavlovic D. Crosstalk of inflammatory mediators and lipid parameters as early markers of renal dysfunction in stable renal transplant recipients with regard to immunosuppression. Ann Transplant 2013;18:414-423.
--

Rezime

Uvod. Transplantacija bubrega je najoptimalniji vid lečenja pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne bolesti. Najčešći uzrok kasnog gubitka grafta je razvoj kardiovaskularne bolesti, koja predstavlja vodeći uzrok smrti pacijenata nakon transplantacije bubrega. U poređenju sa opštom populacijom, recipijenti grafta imaju četiri puta veći rizik za razvoj kardiovaskularne bolesti i dva puta veći rizik za kardiovaskularni mortalitet. Bubrežna disfunkcija se, nakon transplantacije, može smatrati tradicionalnim faktorom rizika. Visoka simpatička aktivnost i akumulacija asimetričnog dimetilarginina (ADMA), endogenog inhibitora endotelne azot monoksid sintaze (eNOS), su netradicionalni faktori rizika, uglavnom vezani za patogenezu hronične bubrežne insuficijencije. Endotelna azot monoksid sintaza može biti značajno inhibirana ADMOM, čija akumulacija u plazmi igra važnu ulogu u nastanku endotelne disfunkcije.

ADMA je uremijski toksin, koji se može smatrati parametrom endotelne disfunkcije, a ukoliko se ubrizga unutar arterija, dovodi do lokalne vazokonstrikcije. Simetrični dimetilarginin (SDMA) ne inhibira eNOS direktno, a koncentracije SDMA u plazmi su, takođe, povišene kod pacijenata sa bubrežnom slabošću, kao i nakon transplantacije. SDMA, bolje nego ADMA, koreliše sa kreatininom i jačinom glomerulske filtracije. ADMA je predložena kao marker ateroskleroze i marker kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta.

Ateroskleroza je opisana kao proces u kome je inflamacija dominantna patološka i biohemijska promena. Razvoj aterosklerotskog plaka direktno zavisi od ekspresije različitih celularnih adhezionih molekula, koji su bitni medijatori u regrutovanju inflamatornih ćelija ka mestu razvoja plaka. Za mnoge faktore je dokazano da povećavaju koncentraciju adhezionih molekula u plazmi: hipertenzija, imunosupresivna terapija, autoimune bolesti i ćelijski posredovano odbacivanje transplantata. Mogu se meriti u

plazmi i stoga predstavljaju potencijalne biomarkere koji mogu da ukažu na prevremenu aktivaciju endotela i stanje hronične inflamacije.

Rezultati velikog broja istraživanja su ukazali da postoji direktna veza između dislipidemije i bubrežne slabosti. Dislipoproteinemija značajno doprinosi progresiji glomerulskih i tubulskih lezija. Faktori koji dovode do dislipidemije nakon transplantacije su starost, telesna težina, lipidni status pre transplantacije, proteinurija i disfunkcija alografta.

Standardna imunosupresivna terapija se sastoji iz tri grupe lekova: kalcineurinski inhibitori (ciklosporin i takrolimus), antiproliferativni lekovi i kortikosteroidi. Kortikosteroidi i ciklosporin, pored nefrotoksičnog efekta, su najznačajniji faktori koji dovodi do izmene lipidnog profila nakon transplantacije. Terapija ciklosporinom, nakon transplantacije bubrega, je nezavisni faktor rizika za razvoj hiperholesterolemije, zato što dovodi do modulacije receptora za LDL holesterol. Kortikosteroidi, ciklosporin, i u manjoj meri takrolimus, dovode do dozno-zavisnog porasta koncentracije holesterola i triglicerida. Povišen ukupni i LDL holesterol se javljaju u oko 60% i hipertrigliceridemija u oko 35% pacijenata nakon transplantacije, niske vrednosti HDL holesterola verifikuju se kod 15% recipijenta grafta.

Visoka aktivnost simpatičkog nervnog sistema je dokazana u terminalnom stadijumu bubrežne bolesti i ta aktivacija se smanjuje, ali se ne normalizuje, nakon uspešne transplantacije bubrega.

Renalaza je novi flavoprotein, koji reguliše tonus simpatičkog nervnog sistema, samim tim i krvni pritisak. Luči se u bubregu i izvesno je da poseduje monoamino oksidaznu aktivnost, jer učestvuje u katabolizmu kateholamina. Ekspresija gena za renalazu detektovana je, pored bubrega, i u kardiomiocitima, jetri i skeletnoj muskulaturi, a takođe u perifernim nervima, centralnom nervnom sistemu, nadbubregu, masnom tkivu, 12,5-dana starom embrionu i endotelnim ćelijama. Cirkuliše u plazmi, u neaktivnoj formi, kao proenzim, čekajući porast koncentracije kateholamina za aktivaciju.

Cilj istraživanja je bio da se proceni postojanje elemenata endotelne disfunkcije (parametara hronične inflamacije i nitroaktivnog stresa) i stepen simpatičke aktivacije, kod stabilnih pacijenata sa transplantiranim bubregom, da se odredi korelacija između

bubrežne disfunkcije i inflamatornih biomarkera, parametara nitrozativnog stresa, poremećaja lipidnog statusa i simpatičke aktivacije, kao i potencijalne razlike ovih parametara u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol, da se utvrdi najbolji nezavisni prediktor za ranu bubrežnu disfunkciju, kao i prediktori nakon multivarijantnog prilagođavanja (prilagođavanje za indeks telesne mase, hipertenziju, pušenje i prisustvo šećerne bolesti).

Metode. Istraživanjem je obuhvaćeno 73 pacijenata nakon transplantacije, sa stabilnom funkcijom grafta, bez klinički manifestne kardiovaskularne bolesti, na standardnom imunosupresivnom protokolu i postransplantacionim periodom od najmanje 12 meseci. Istraživanje je sprovedeno na Klinici za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju Kliničkog centra u Nišu i Medicinskom fakultetu u Nišu, u periodu od marta do decembra 2012. godine. Odobreno je od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu i svaki pacijent je potpisao informisani pristanak za učestvovanje u istraživanju.

Rezultati. Značajne razlike postojale su između kliničke i kontrolne grupe u vrednostima sistolnog ($p < 0,001$) i dijastolnog krvnog pritiska, ($p < 0,001$), ureje ($p < 0,001$), kreatinina ($p < 0,001$), klirensa kreatinina ($p < 0,001$), hemoglobina ($p = 0,003$), leukocita ($p = 0,003$), ukupnog holesterola ($p < 0,001$), LDL-holesterola ($p = 0,009$), nonHDL holesterola ($p < 0,001$), triglicerida ($p < 0,001$), odnosa: non-HDL/HDL ($p = 0,03$), ukupni holesterol/HDL ($p = 0,046$), kao i odnosa Tg/HDL ($p = 0,007$). Plazmatske koncentracije nitrata ($p < 0,001$), eNOS ($p < 0,001$), ADMA ($p = 0,001$), SDMA ($p < 0,001$), renalaze ($p < 0,0001$), ICAM-1 ($p < 0,001$) i VCAM-1 ($p < 0,001$) su bile značajno više u odnosu na kontrolu. Kao nezavisni faktori rizika za smanjene jačine glomerulske filtracije izdvajale su se vrednosti ukupnog holesterola više od 5,19 mmol/l, LDL holesterola $> 4,1$ mmol/l, nonHDL $> 4,2$ mmol/l i koncentracije VCAM-1 molekula. Nakon prilagođavanja za faktor godina i u multivarijantnom modelu kao faktori rizika uzdvojile su se koncentracije ukupnog holesterola $> 5,2$ mmol/l, LDL $> 4,1$ mmol/l, nonHDL $> 4,2$ mmol/l i više vrednosti VCAM-1 molekula. HDL, trigliceridi, CRP i lipoprotenski odnosi nisu pokazali značaj kao faktori rizika za bubrežnu disfunkciju. Nije bilo razlike u ispitivanim parametrima u odnosu na primenjeni vid imunosupresivne terapije.

Koncentracija renalaze je bila nezavistan faktor rizika za smanjenje glomerulske filtracije kod recipijenata grafta ($p = 0,026$); takođe nakon prilagođavanja za godine

($p=0,042$), kao i nakon multivarijantnog prilagođavanja ($p=0,032$). Povećana plazmatska aktivnost eNOS pokazala je protektivni značaj za funkciju bubrega ($p=0,011$), nakon prilagođavanja za godine ($p=0,045$) i posle multivarijantnog prilagođavanja ($p=0,014$). Značajne razlike uočene su u koncentraciji renalaze kod pacijenata na ciklosporinu ($p=0,027$). Statistički značajna inverzna korelacija postojala je između renalaze i glomerulske filtracije ($p<0,001$), pozitivna korelacija između renalaze i kreatinina ($p=0,003$), renalaze i ukupnog holesterola ($p<0,001$), renalaze i LDL holesterola ($p=0,046$) i renalaze i nonHDL holesterola ($p=0,01$). Postojala je značajna razlika u koncentraciji renalaze u odnosu na stadijum bubrežne slabosti ($p<0,001$), kao i pozitivna korelacija sa leukocitima ($p=0,032$). Nije bilo razlike u koncentracijama renalaze u odnosu na primenjeni vid antihipertenzivne terapije, godinama ispitanika, pušenje, komorbiditete, poreklo transplantata, pol, godine.

Zaključak. Renalaza je dokazana kao nezavistan faktor rizika za smanjene bubrežne funkcije nakon transplantacije bubrega. eNOS je identifikovana kao zaštitni faktor za bubrežnu funkciju. Renalaza je obrnuto proporcionalna jačini glomerulske filtracije, a pozitivno sa vrednostima kreatinina i lipidnim poremećajima, ali nije u korelaciji sa parametrima endotelne disfunkcije i najverovatnije je određena funkcijom bubrega. Ukupni holesterol, LDL, nonHDL i VCAM-1 su u inverznoj korelaciji sa glomerulskom filtracijom i nezavisni su prediktori za smanjenje glomerulske filtracije, kao i nakon multivarijantnog prilagođavanja. Koncentracije HDL-holesterola, C-reaktivnog proteina, triglicerida i ICAM-1 nemaju uticaj bubrežnu funkciju. Svi evaluirani parametri inflamacije i lipidnog statusa nisu se razlikovali između grupa u pogledu imunosupresivne terapije. Koncentracija renalaza je bila viša u grupi pacijenata na ciklosporinu, a ovi pacijenti su imali i više vrednosti ureje i kreatinina.

Ključne reči: ADMA, SDMA, adhezioni molekuli, bubrežna disfunkcija, dislipidemija, eNOS, inflamacija, krvni pritisak, transplantacija bubrega, renalaza.

Abstract

Introduction. Renal replacement therapy remains the treatment of option for patients in end stage renal disease. The most frequent cause of late allograft loss is cardiovascular disease, which constitutes the leading cause of death of renal transplant recipients (RTR). When compared with the general population, RTR show a four-fold greater risk for CVD, and a two-fold higher risk for cardiovascular death. Renal transplant dysfunction can be considered as a traditional risk factor, while high sympathetic activity and accumulation of the endogenous inhibitor of endothelial NO synthase (eNOS), asymmetric dimethylarginine (ADMA) are factors peculiar to chronic renal failure. eNOS can be strongly inhibited by ADMA, whose accumulation in plasma may play an important role in endothelial dysfunction.

ADMA is an uremic toxin that can be considered as parameter of endothelial dysfunction. ADMA, also, causes local vasoconstriction when infused intra-arterially. Symmetric dimethylarginine (SDMA) does not inhibit NOS directly, and is also elevated in patients with renal failure, its levels, better than ADMA, correlate with glomerular filtration rate (GFR). ADMA was proposed to be a marker for atherosclerotic changes, and for the assessment of cardiovascular morbidity and mortality.

Atherosclerosis is today described as a disease where inflammation is the dominant pathological and biochemical alteration. The development of the atherosclerotic plaque is closely linked to expression of different cellular adhesion molecules (CAMs), that are essential mediators, playing a central role in the recruitment of inflammatory cells to the site development. Many factors were demonstrated to increase concentration of cellular adhesion molecules: hypertension, immunosuppressive therapy, autoimmune disease and cell mediated allograft rejection. These CAMs can be measured in plasma and therefore may represent promising biomarkers that may reflect underlying endothelial activation and vascular inflammation.

Besides inflammation many studies have generally suggested a positive association between dyslipidemia and end stage renal disease and advanced chronic kidney failure. Renal disease is associated with profound abnormalities in lipids and lipoprotein metabolism and in renal transplant recipients hyperlipidemia is a well known feature. It has been suggested that dyslipoproteinemia observed in kidney disease contributes to the progression of glomerular and tubular lesions, with deterioration to end stage renal disease. Factors that induce post-transplant dyslipidemia include age, body weight, pre-transplant lipid levels, presence of proteinuria and allograft dysfunction.

Standard immunosuppressive therapy usually consists of triple drug therapy of three drug classes: calcineurin inhibitors, anti-proliferative agents and corticosteroids. Corticosteroids and cyclosporine, besides the nephrotoxic effect, seem to be one of the main contributing factors that influence the post-transplant lipidemic profile. Cyclosporine plays an independent role in elevating cholesterol levels by modulating the low density lipoprotein (LDL) receptors. Corticosteroids, cyclosporine and tacrolimus (to a lesser degree than cyclosporine) increase post-transplant cholesterol and triglycerides levels, usually in dose dependent fashion. Elevated total and LDL cholesterol occur in about 60% and hypertriglyceridemia in about 35%, whereas low high density (HDL) cholesterol is present in only 15% of renal transplant recipients.

Enhanced sympathetic activity is frequently reported in end stage renal disease, and such activation declines, but does not normalize, after successful kidney transplantation.

Renalase is a new flavoprotein that regulates sympathetic tone and blood pressure. It is secreted by the kidney and is reported that has monoamine oxidase (MAO) activity, therefore may metabolize catecholamines. Cardiomyocytes, liver and skeletal muscles also secrete renalase, and it was found in peripheral nerves, central nervous system, adrenals, adipose tissue, 12.5-day-old embryo and endothelium. It circulates in the blood as a proenzyme waiting for elevated catecholamines for activation.

The purpose of the study was to observe parameters of endothelial dysfunction (parameters of chronic inflammation and nitrosative stress), lipid profile disturbances and the level of sympathetic activity in the stable renal transplant recipients, to assess correlations between renal dysfunction and inflammatory biomarkers, lipid profile

disturbances, nitrosative stress and sympathetic activity, as well as potential differences in these parameters in regard to immunosuppressive protocol, and among them to hypothesize the best independent predictor, and predictors of early renal dysfunction after multivariate modeling (adjustment for age, body mass index, hypertension, smoking and diabetes mellitus).

Methods. We enrolled 73 renal transplant recipients, who were greater than 12 months post-renal transplant surgery, had a stable graft function, no clinically present cardiovascular disease and were on standard immunosuppression. The study was conducted between March and November 2012 at the Clinic for Nephrology, Dialysis and Transplantation, Clinical Centre Nis. Ethics Committee of Medical Faculty Nis approved the study and fully informed written consent was obtained from each patient.

Results. Significant differences were found between clinical and control group in systolic blood pressure, ($p < 0.001$), diastolic blood pressure, ($p < 0.001$), urea ($p < 0.001$), creatinine ($p < 0.001$), creatinine clearance ($p < 0.001$), hemoglobin ($p = 0.003$), white blood cells, ($p = 0.003$), total cholesterol ($p < 0.001$), non-HDL ($p < 0.001$) and Tg ($p < 0.001$). Plasma concentration of nitrates ($p < 0.001$), eNOS ($p < 0.001$), ADMA ($p = 0.001$), SDMA ($p < 0.001$), renalase ($p < 0.0001$), ICAM-1 ($p < 0.001$), and VCAM-1 ($p < 0.001$), were statistically increased with regard to controls. Non-adjusted OR showed that there was a significant risk of reduced GFR in patients with total cholesterol higher than 5.19 mmol/L, LDL cholesterol ≥ 4.1 mmol/L, non-HDL ≥ 4.2 mmol/L and higher VCAM-1 concentration. After adjustment for age and in multivariable model OR showed a significant risk for reduced GFR in patients with total cholesterol ≥ 5.2 mmol/L, LDL ≥ 4.1 mmol/L, non-HDL ≥ 4.2 mmol/L and higher VCAM-1 concentration. HDL, triglycerides, CRP and lipoprotein ratios did not have any significance as predictors of renal dysfunction. Finally, there were no differences in all evaluated parameters between groups in regard to immunosuppressive therapy. Total cholesterol, LDL, non-HDL and VCAM-1 are strong and independent predictors of renal dysfunction in stable renal transplant recipients. In contrast HDL, CRP, triglycerides and ICAM-1 did not seem to have any impact on renal dysfunction.

Non-adjusted OR showed that there was a significant risk of reduced eGFR in transplant recipients with increased renalase activity ($p = 0.026$); age-adjusted OR showed

a significant risk of reduced eGFR with increased renalase activity ($p=0.042$), also after multivariable adjustment ($p=0.032$). Increased plasma eNOS activity was protective factor for eGFR ($p=0.011$), also after adjustment for age ($p=0.045$), and after multivariate modeling, eNOS was shown to be protective factor for eGFR ($p=0.014$). Significant differences with respect to immunosuppression were in plasma renalase in patients maintained on cyclosporine ($p=0.027$), as well as differences in eGFR ($p=0.034$).

We found statistically significant inverse correlation between renalase and eGFR ($p<0.001$), positive correlation between renalase and creatinine ($p=0.003$), total cholesterol ($p<0.001$), LDL-cholesterol ($p=0.046$), and non-HDL cholesterol ($p=0.01$). There was a significant difference in plasma renalase with regard to chronic kidney disease stages ($p<0.001$). Renalase correlated with leukocytes, but did not correlate with C-reactive protein. Renalase did not correlate with any of parameters of endothelial dysfunction, neither with some demographic data (gender, age, time or type of transplantation, risk factors). There were no differences in renalase activity with regard to antihypertensive therapy.

Conclusion. Renalase was shown to be strong predictor for decreased eGFR in stable renal recipients. eNOS was identified as a strong protective factor for eGFR. Renalase strongly and inversely correlated with eGFR, positively with creatinine and lipid disturbances, but did not correlate with endothelial dysfunction parameters, and is most probably determined by kidney function. Total cholesterol, LDL, non-HDL and VCAM-1 strongly and inversely correlated with glomerular filtration rate and were shown to be independent predictors for decreased GFR, as well as predictors by multivariate modeling. In contrast there was no correlation of HDL, CRP, triglycerides and ICAM-1 with glomerular filtration rate. All evaluated lipid and inflammation parameters did not differ between the groups in respect to immunosuppression therapy protocol. Renalase was significantly higher in the group of patients on cyclosporine.

Key words: ADMA, SDMA, adhesion molecules, blood pressure, dyslipidemia, eNOS, inflammation, kidney transplantation, renalase, renal dysfunction.

Sadržaj

1.0. Uvod.....	1
2.0. Pregled literature.....	4
2.1. Endotel-fiziologija i patofiziologija.....	4
2.1.1. Azot monoksid kao glavni regulator vaskularne homeostaze.....	5
2.1.2. Azot monoksid i bubreg.....	7
2.1.3. Endotelna azot monoksid sintaza.....	8
2.1.4. Endotelna aktivacija i reparacija.....	9
2.1.5. Endotel kao ciljno mesto oštećenja u bolestima bubrega i kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.....	12
2.1.6. Endotelna disfunkcija i poremećaj metabolizma dimetilarginina.....	12
2.1.6.1. Asimetrični dimetilarginin kao endogeni inhibitor azot monoksida.....	13
2.1.6.2. Intracelularne i plazmatske koncentracije ADME.....	16
2.1.6.3. Eliminacija ADME iz organizma.....	16
2.1.6.4. ADMA u progresiji bubrežnog oštećenja.....	18
2.1.6.5. Simetrični dimetilarginin.....	18
2.1.7. Endotelna disfunkcija, inflamacija i ateroskleroza.....	19
2.1.7.1. Inicijacija i progresija ateroskleroze.....	20
2.1.7.2. Celularni adhezioni molekuli.....	21
2.1.7.3. C-reaktivni protein.....	23
2.1.7.4. Lipoproteini krvne plazme.....	24
2.1.7.4.1. Modifikacija/karbamilacija LDL-holesterola u uremiji.....	24
2.1.7.4.2. Modifikacija HDL-holesterola ka proinflamatornom molekulu.....	25
2.1.8. Procena endotelne disfunkcije.....	26
2.2. Imunosupresivna terapija.....	27
2.2.1. Kalcineurinski inhibitori-ciklosporin i takrolimus.....	29
2.2.1.1. Patofiziološki efekti kalcineurinskih inhibitora.....	31
2.2.2. Mikofenolat mofetil i mikofenolična kiselina.....	34
2.2.3. Imunska modulacija i indukcija imunotolerancije.....	35
2.3. Simpatički nervni sistem u bolestima bubrega.....	35
2.3.1. Identifikacija i karakterizacija renalaze.....	37
2.3.2. Renalaza-regulacija sekrecije i patofiziološki efekti.....	38
2.3.3. Renalaza i dopaminergički sistem bubrega.....	40
2.3.4. Uloga renalaze u patogenezi oštećenja bubrega i razvoju kardiovaskularnih bolesti.....	41
3.0. Ciljevi istraživanja.....	43
4.0. Ispitanici i metode istraživanja.....	44
4.1. Ispitanici.....	44
4.2. Metode.....	46
4.2.1. Hematološko-biohemijske analize.....	46

4.2.2. Određivanje koncentracija adhezionih molekula, renalaze i eNOS.....	46
4.2.3. Određivanje koncentracija dimetilarginina.....	47
4.2.4. Određivanje koncentracija nitrita i nitrata	47
4.3. Statističke analize.....	48
5.0. Rezultati	49
5.1. Demografske karakteristike ispitanika.....	49
5.2. Poređenje demografskih i kliničkih parametara kliničke i kontrolne grupe	51
6.0. Diskusija	70
6.1. Endotelna disfunkcija u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom	70
6.1.1. Adhezioni molekuli kao parametri inflamacije kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na kontrolnu grupu.....	71
6.1.2. Lipidni status nakon transplantacije.....	73
6.1.3. Koncentracije dimetilarginina kod pacijenata nakon uspešne transplantacije bubrega.....	75
6.1.4. Koncentracije eNOS i nitrata kod pacijenata nakon uspešne transplantacije bubrega.....	78
6.2. Koncentracije renalaze kod pacijenata sa transplantiranim bubregom i međusobne korelacije svih ispitivanih parametara	81
6.3. Prediktori procene bubrežne funkcije kod pacijenata nakon uspešne transplantacije bubrega.....	86
6.4. Uticaj imunosupresivne terapije na parametre endotelne disfunkcije	89
7.0. Zaključak.....	94
8.0. Literatura.....	97
Lista skraćenica.....	118
Lista tabela	120
Lista grafikona	122
Lista slika	123
Biografija autora	124

1.0. Uvod

Uvođenje postupka transplantacije organa nesumnjivo je jedan od najvećih napredaka moderne medicine. Ovo je tretman koji ne samo da omogućava produženje životnog veka pacijenata sa gubitkom funkcije organa (bubrega, srca, jetre i dr), već pruža mogućnost i potpune rehabilitacije. Transplantacija kao metoda lečenja je osamdesetih godina prošlog veka bila eksperimentalna, vrlo rizična, a u kliničkim uslovima privilegija malog broja transplantacionih centara u visoko razvijenim zemljama. Danas je to široko rasprostranjena i gotovo rutinska operacija u više od 80 država širom sveta. Najveći broj transplantacija na godišnjem nivou uradi se u Sjedinjenim Američkim Državama (oko 13000), Kini, Brazilu i Indiji, a najveći napredak na ovom polju zabeležen je u Austriji, Hrvatskoj, Norveškoj, Portugaliji i Španiji.

Transplantacija bubrega je najoptimalniji vid lečenja pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne bolesti. U odnosu na druge dve metode lečenja, hemo i peritoneumsku dijalizu, značajno dovodi do poboljšanja kvaliteta života i produženja životnog veka pacijanata, ujedno je i najjeftiniji vid lečenja ovih pacijenata. Podaci američkog registra US Renal Data System-a ukazuju da je stopa preživljavanja pacijenata sa transplantatom u odnosu na pacijente na dijalizi značajno viša za sve starosne kategorije. Najviša je u populaciji mladih pacijenata, kao i kod pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom. Potreba za transplantacijom bubrega naročito će rasti sa porastom incidencije dijabetesne nefropatije. Ovde je, s obzirom na dužinu preživljavanja u odnosu na druge vidove aktivnog lečenja hronične bubrežne slabosti, ovo metoda izbora.

Istorijat transplantacije počinje prvom uspešnom transplantacijom bubrega između jednojajčanih blizanaca, u Bostonu 23. decembra 1954. godine i predstavlja početak nove ere u lečenju bubrežne insuficijencije. Pre otkrića imunosupresivne terapije

oko 60% recipijenata je imalo epizode akutnog odbacivanja grafta unutar prve godine nakon transplantacije. Kako se transplantacija razvijala kao metoda, u periodu između 1965. i 1980. stopa preživljavanja je progresivno rasla na oko 90% preživelih unutar prve godine. Ključni trenutak bio je uvođenje ciklosporina u standardni terapijski protokol sredinom osamdesetih godina. To je dovelo do značajnog preživljavanja grafta, pa se stopa preživljavanja računala za period od pet godina. Trostruki imunosupresivni protokol u kombinaciji sa boljom tipizacijom tkiva, prezervacijom organa i preveniranjem oštećenja tokom same intervencije (toplo-hladna ishemija) doveli su do značajnog napretka u preživljavanju grafta.

Akutno odbacivanje alografta visoko i nezavisno koreliše sa njegovom hroničnom disfunkcijom, odnosno smanjenjem incidencije akutnog odbacivanja objašnjava se porast preživelih alografta. Dokazano je da pacijenti bez akutne epizode odbacivanja imaju na godišnjem nivou smanjenje relativnog rizika za hronično odbacivanje 6,3%. Pacijenti, pak, koji su doživeli jednu ili više epizoda odbacivanja grafta u prvoj godini nakon transplantacije imaju smanjenje rizika samo za 0,4%. Za populaciju sa visokim titrom donor-specifičnih HLA antitela, koji se smatraju nepodesnim kandidatima za transplantaciju, uvode se protokoli za desenzitizaciju, tako da se smatra da u doglednoj budućnosti neće biti pacijenata kod kojih je kontraindikovano izvođenje procedure.

Ako se uzme u obzir da su faktori koji mogu da dovedu do akutnog odbacivanja grafta uglavnom poznati, te tako mogu biti i eliminisani, kratkoročno preživljavanje grafta više ne predstavlja najveći problem u transplantaciji. Najznačajniji problem tokom praćenja ovih pacijenata, a istovremeno i izazov za sve članove transplantacionog tima, predstavlja dugoročno preživljavanje grafta i sprečavanje razvoja kasnih komplikacija. Međutim najčešći uzrok smrtnosti pacijenata sa transplantiranim bubregom je razvoj komplikacija na kardiovaskularnom sistemu.

Recipijenti grafta imaju u odnosu na populaciju zdravih 35-50% veću učestalost kardiovaskularnih komplikacija i oko 4 puta veći rizik za smrti ishoda. Neke studije su pokazale da više od 50% pacijenata sa transplantatom umire od posledica ishemijske bolesti srca. Rizik od nastanka srčane ishemije je za 20% viši u populaciji obolelih od šećerne bolesti, a za 6,4% viši u populaciji bez dijabetesa, u odnosu na zdravu populaciju. Iste studije su pokazale da ne postoje razlike u starosti ispitanika (55-64 godina). Ako se

posmatra rizik za razvoj angine pektoris, viši je 12-16 puta u starosnoj grupi od 40 do 49 godina u odnosu na opštu populaciju i 3-4 puta viši za populaciju starosne dobi od 60 do 69 godina. Ipak smrtnost od kardiovaskularne bolesti (KVB) je u poređenju sa pacijentima na dijalizi svakako niža. Godišnji mortalitet od KVB u populaciji pacijenta na dijalizi je 9,1%, u populaciji pacijenata sa transplantatom 0,54%, dok je u populaciji zdravih 0,28%. Imunosupresivna terapija je jedan od glavnih faktora u razvoju pomenutih komplikacija.

Ovi pacijenti u sklopu svoje primarne bubrežne bolesti, kao i zahvaljujući dugoj ekspoziciji faktorima rizika tokom uremije (i dijaliznog perioda) i samog ishemijsko-reperfusionog oštećenja bubrega tokom operacije i nakon transplantacije, imaju znake endotelne disfunkcije. Endotelna disfunkcija, odnosno oštećenje endotela je najznačajniji faktor u patogenezi kardiovaskularne bolesti i zajedno sa aterosklerozom leži u osnovi kardiovaskularnih komplikacija.

2.0. Pregled literature

2.1. Endotel-fiziologija i patofiziologija

Endotel oblaže unutrašnjost krvnih sudova i istovremeno predstavlja žlezdu sa unutrašnjim lučenjem, koja se sastoji od oko 10^{13} endotelnih ćelija, teži oko 1kg i ima površinu od oko 4000-7000 m².^{1,2} Razumevanje fiziologije endotela na treba bazirati samo na njegovoj ulozi fizičke barijere između cirkulacije i krvnih sudova, već ga treba posmatrati kao organ signalne transdukcije. Usled promena u cirkulaciji fenotip endotelnih ćelija može biti modifikovan.³ Fundamentalni je organ u održanju vaskularne homeostaze i ima precizan i dobro programiran odgovor na različite fizičke i hemijske signale iz cirkulacije. Sintetiše biomolekule koji regulišu vaskularni tonus, inhibišu adheziju ćelija i inflamaciju, agregaciju trombocita i proliferaciju glatkomišićnih ćelija.⁴ Fenotip endotelnih ćelija može značajno da varira u svojoj strukturi ili funkciji, čak i u morfološki i funkcionalno veoma sličnim tkivima (npr. glomerularnim i peritubularnim kapilarima) njihova funkcija može da bude strogo specijalizovana. U svim vaskularnim koritima, uključujući i bubreg, endotelne ćelije pokazuju visok stepen aktivnosti, a samo intaktan endotel je od ključne važnosti za pomenute funkcije.

Prva zapažena i najbolje proučena funkcija endotela je u održanju tonusa krvnih sudova. Ova uloga podrazumeva sposobnost sinteze potentnih vazoaktivnih molekula, bradikininina ili trombina, koji učestvuju u procesima relaksacije i konstrikcije krvnog suda.⁴ Ovakva vazomocija održava ravnotežu između metaboličkih zahteva i oksigenacije tkiva, regulacije tonusa i dijametra krvnog suda, a takođe ima ulogu i u remodelovanju vaskularne strukture i dugotrajne perfuzije tkiva.⁵ Ključni molekul koji u vaskularnoj fiziologiji koji održava integritet krvnih sudova je azot monoksid (NO). Svako smanjenje njegove sinteze, inhibicija delovanja ili smanjenje bioraspoloživosti dovode do redukcije funkcije endotela.

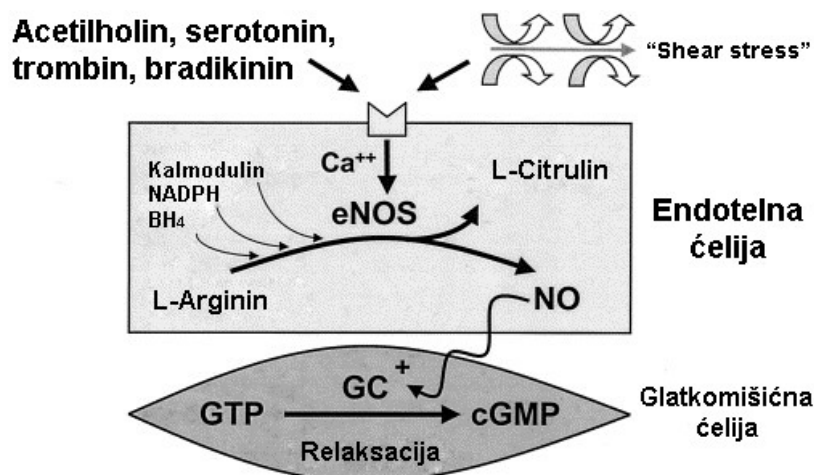
Pored učešća azot monoksida, vazodilatacija može da se ostvari aktivacijom kalijumovskih kanala i depolarizacijom glatkomišićnih ćelija.⁶ Mehanizmi ovakve relaksacije, kao i učešće hiperpolarizujućih faktora endotelnog porekla, (endothelium derived hyperpolarizing factor-EDHF: faktori porekla citohroma i C-natriuretski peptid) su još uvek nedovoljno razjašnjeni. Postoji mogućnost da se ovi faktori razlikuju u odnosu na vaskularno korito.⁴ Poznato je da EDHF može da kompenzuje izostanak efekta azot monoksida, naročito u mikrocirkulaciji, što je od velikog značaja ukoliko je bioraspoloživost NO smanjena.⁷ Prostaciklin je endotelnog porekla, iz sistema ciklooksigenaza i svoj vazodilatatorni efekat ostvaruje nezavisano od aktivacije NO,⁸ ali se smatra da je njegov efekat na relaksaciju krvnih sudova ograničenog delovanja.

Endotel učestvuje u modulaciji vazomocije i aktiviranjem molekula sa efektom vazokonstrikcije: endotelina i vazokonstriktornih prostanoida, kao i putem konverzije angiotenzina I u angiotenzin II na površini endotela.^{9,10} Ovi vazokonstriktori predominantno deluju lokalno, ali pod određenim uslovima mogu da imaju sistemski efekat i učestvuju u remodelovanju krvnih sudova.

2.1.1. Azot monoksid kao glavni regulator vaskularne homeostaze

Prva zapažanja o vazoaktivnim sposobnostima azot monoksida datiraju iz osamdesetih godina prošlog veka kada je nazvan faktor relaksacije endotelnog porekla (endothelium derived relaxing factor-EDRF). Ovaj molekul gasa i relativno nestabilan diatomni slobodni radikal, je najpotentniji, za sada poznati, endogeni vazodilatator. Azot monoksid nastaje oksidacijom amino kiseline L-arginina, u prisustvu kofaktora tetrahidrobiopterina,¹¹ delovanjem specifične grupe enzima, azot monoksid sintaza (NOS), (slika 1). Za sada su opisane tri različite izoforme NOS, izolovane iz endotelnih ćelija, endotelna (eNOS), neuronalna (nNOS) i inducibilna (iNOS). Nakon produkcije, NO difunduje u glatkomišićne ćelije, gde dovodi do njihove relaksacije aktivacijom solubilne guanilat ciklaze (reagujući sa gvožđem) sa porastom intracelularnih koncentracija cikličnog guanozin monofosfata (cGMP).⁴ cGMP aktivira nekoliko proteinskih kinaza dovodeći do izlaska Ca iz ćelija, povećanog preuzimanja od strane sarkoplazmatskog retikuluma i posledične vazodilatacije.

NO kao signalni molekul učestvuje u različitim biološkim procesima u humanoj populaciji: regulaciji neurotransmisije, antimikrobnoj zaštiti, održanju ventilacije, sekreciji hormona, angiogenezi, inflamaciji, zaštiti od ishemijsko-reperfuzionih oštećenja i aktivaciji imunskog odgovora.¹²



Slika 1. Sinteza azot monoksida i mehanizam relaksacije glatkomišićne ćelije preuzeto iz Govers R¹³

Farmakološka blokada ili genski deficit eNOS smanjuje stvaranje NO, kompromituje vazodilataciju i povećava vaskularni otpor. NO se kao ključni modulator protoka krvi i održanja krvnog pritiska, sekretuje kao odgovor na istežanje krvnog suda (fizička aktivnost povećava njegovu sintezu i sekreciju). Stimulatori njegovog oslobađanja su i vazokonstriktori tipa: noradrenalin, endotelin, angiotenzin II i serotonin, a njegova produkcija može biti stimulirana i aplikacijom acetilholina i bradikininina.¹³ Kod pacijenata sa koronarnom bolešću, nedovoljna bioraspodivnost NO dovodi do izražene ishemije. Osim vazodilatatornog efekta, NO ima snažan anti-aterosklerotski efekat, tako da njegova deficijencija dovodi do razvoja ateroskleroze i dalje ishemije. Ovaj molekul smanjuje vaskularnu produkciju superoksidnih radikala, stepen oksidativnog oštećenja i mogućnost oksidacije LDL-holesterola. Osim pomenutih efekata NO učestvuje u modulaciji krvnih sudova, odnosno održanju njihove strukture, na taj način što suprimira proliferaciju glatkomišićnih ćelija (blokiranjem sinteze DNK i mitogeneze).¹⁴ Hronični deficit ovog molekula doprinosi zadebljanju tunike medije i/ili hiperplazije tunike intime krvnog suda, što je od najvećeg značaja u patogenezi aterosklerotskog plaka.¹⁵ U

eksperimentalnom modelu genska terapija sa NOS dovodi do redukcije vaskularne lezije nastale nedostatkom NO.¹⁶ Osim toga intaktan endotel onemogućava interakciju zida krvnog suda i uobličanih ćelijskih elemenata: ćelija limfo-monocitne linije interferiranjem ili blokiranjem leukocitnih adhezionih receptora (CD11/CD18) i trombocita (porastom intracelularnih nivoa cGMP),¹⁴ pri čemu onemogućava kontakt glatke muskulature i trombocitnog faktora rasta. Inhibiciju trombocitne agregacije azot monoksid ostvaruje sinergistički sa drugim vazodilatatorom endotelnog porekla-prostaciklinom PGI₂. Deluje antiinflamatorno tako što blokira aktivaciju endotelnih ćelija sprečavanjem ekspresije nuklearnog faktora κB (NFκB), delujući putem najmanje dva različita mehanizma i blokirajući nuklearnu translokaciju aktivne subjedinice, koja je odgovorna za ekspresiju adhezionih molekula i proinflamatornih citokina.¹⁷ Smanjenje bioraspoloživosti NO je inicijalni događaj u vaskularnim bolestima i značajno doprinosi daljem razvoju vaskularnih lezija.

2.1.2. Azot monoksid i bubrež

Azot monoksid učestvuje u kontroli bubrežne hemodinamike i u procesu formiranja urina, delujući na različitim nivoima nefrona. Vršiti dilataciju aferentne i eferentne arteriole, povećava jačinu glomerulske filtracije i menja koncentraciju natrijuma kroz različite segmente bubrežnih tubula i sabirnih kanalića. Tako da inhibicija sinteze NO ima snažan sistemski efekat, ali i lokalno, na nivou samog bubrega. Eksperimenti na zdravim dobrovoljcima su pokazali da infuzija endogenih inhibitora eNOS, dovodi do doznog zavisnog pada u renalnom protoku plazme, kao i u porastu vaskularne rezistencije, dok jačina glomerulske filtracije ostaje nepromenjena.

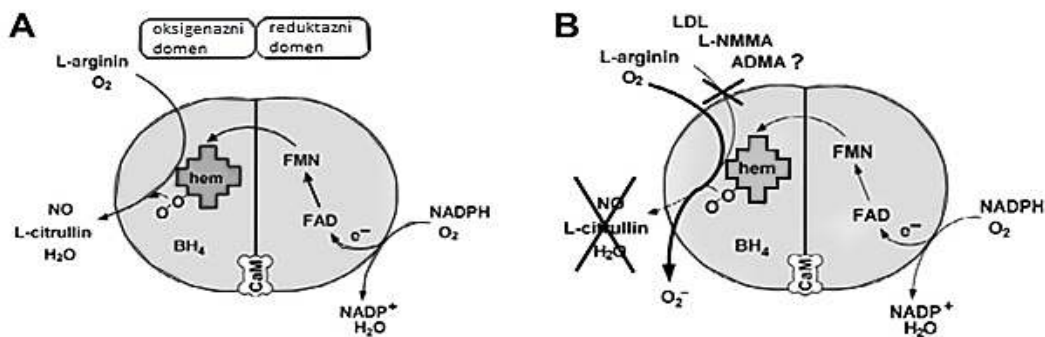
Na nivou bubrega sinteza arginina se dešava uglavnom na nivou proksimalnih tubula, mada je eNOS identifikovana i u glomerulima, krvnim sudovima, bubrežnim tubulima i sabirnim kanalićima.^{18,19} Druga izoforma NOS (inducibilna-iNOS) je eksprimirana u glatkim mišićima krvnih sudova bubrega, distalnom kraju eferentne arteriole i ascedentnom kraku Henleove petlje.²⁰ Citokini koji stimulišu iNOS su pronađeni u kulturi ćelija proksimalnih tubula, medularnom segmentu sabirnih kanalića i mezangijalnim ćelijama.²¹

Bubrežni protok pozitivno koreliše sa endotel-zavisnom vazodilatacijom, a endotelne ćelije bubrežnih „*vasa recta*“ normalno proizvode NO. Iz tih razloga inhibicija sinteze NO na nivou bubrega je inicijalni događaj kojim započinju brojni patofiziološki procesi.²²

- Smanjenje jačine glomerulske filtracije, sa porastom vaskularnog otpora u eferentnoj i aferentnoj arterioli
- Redukcija ukupnog bubrežnog protoka sa porastom totalnog vaskularnog otpora u bubregu
- Inicijalno smanjenje sekrecije renina
- Porast krvnog pritiska sa oštećenjem ekskretorne funkcije bubrega, u prvom redu smanjenje eliminacije Na
- Smanjenje stimulacije za transport Na^+ i HCO_3^- na nivou proksimalnih tubula, posredovanih cGMP
- Produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta
- Produkcija peroksinitrita u prisustvu superoksidnog anjona

2.1.3. Endotelna azot monoksid sintaza

Sve tri forme azot oksid sintaza (NOS) su monomeri. Svaka subjedinica se sastoji od oksidaznog (nosi prostetičnu hem grupu) i reduktaznog domena (vezuje NADPH, FAD i FMN), slika 2. Prisustvo hem grupe omogućava dimerizaciju NOS-a, zapravo hem je jedini kofaktor koji je apsolutno neophodan za formiranje aktivnih dimera. Oksidazni domen vezuje kofaktore: 5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (BH_4), molekularni kiseonik (O_2) i supstrat L-arginin. Reduktazni domen vezuje još i kalmodulin (CaM) koji stimuliše transfer elektrona.¹⁴ Sintaza NO se odigrava u dva ciklusa: u prvom ciklusu NOS vrši hidroksilaciju L-arginina do N-hidroksi-L-arginina, a u drugom ciklusu dolazi do njegove oksidacije, pri čemu nastaju NO i L-citrulin, kao međuprodukt.¹⁴



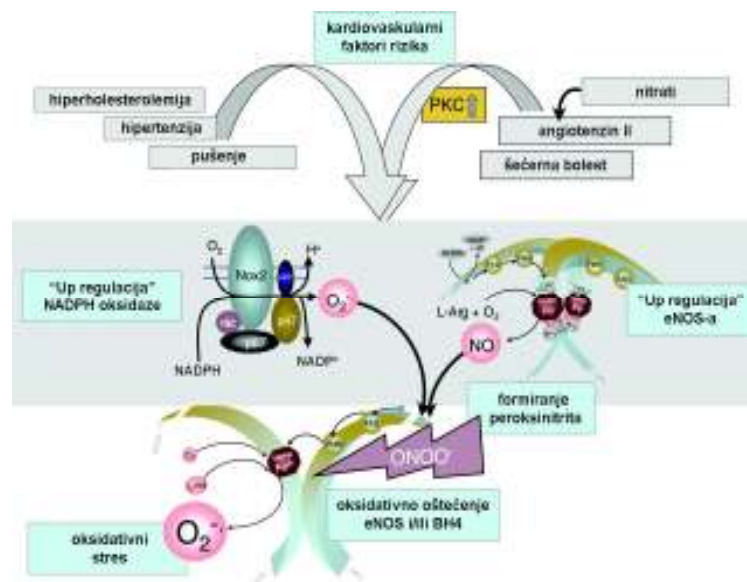
Slika 2. Građa i metabolizam azot monoksid sintaze preuzeto iz Boger RH et al.⁴⁶

Endotelna azot monoksid sintaza (eNOS) je primarni endogeni izvor NO i njena ekspresija je u direktnoj vezi sa koncentracijom nitrita u plazmi,^{23,24} uz pretpostavku da nitriti bolje reflektuju bioraspoloživost azot monoksida.²⁴ Akutna ili hronična administracija arginina povećava produkciju eNOS, popravljajući funkciju endotela i smanjuje rizik od ateroskleroze.²⁵ Sinteza NO može biti selektivno inhibisana gvanidinom supstituisanim analogima L-arginina, koji kompetitivno blokiraju aktivni deo eNOS. Prve studije koje su urađene na animalnim modelima, kao farmakološke blokatore bioraspoloživosti azot monoksida ispitivale su N-monometil L-arginin (L-NMMA) i N-nitro L-arginine metil ester (L-NAME). Kao posledica blokade došlo je do razvoja hipertenzije. Nakon rezultata na animalnom modelu analozi L-arginina su detektovani u humanim tečnostima, plazmi i urinu i označeni su kao endogeni inhibitori NOS.

2.1.4. Endotelna aktivacija i reparacija

Uobičajeno se promena funkcije endotelних ćelija definiše kao endotelna disfunkcija, međutim sa patofiziološkog aspekta pogodniji termin je endotelna aktivacija. Ona predstavlja promenu aktivnosti endotela: od stanja mirovanja do odgovora na delovanje različitih faktora endotelnih oštećenja.⁴ Endotelna disfunkcija u suštini označava delimičan ili potpuni disbalans između vazokonstriktornih i vazodilatatornih činilaca. Drugim rečima to je narušena ravnoteža između faktora promocije i inhibicije rasta, proaterogenih i antiaterogenih faktora i između prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora.

Faktori oštećenja endotela najčešće aktiviraju njegove unutrašnje molekularne mehanizme, što rezultuje ekspresijom citokina i adhezionih molekula na endotelnim ćelijama, leukocitima i trombocitima, odnosno pokreće mehanizam hronične inflamacije.²⁶ Osnovni patofiziološki mehanizam je aktivacija redoks signalizacije i promena u delovanju NO⁴ (slika 3).



Slika 3. Mehanizmi oštećenja endotela preuzeto iz Förstermann U et al.¹⁴

Reaktivne kiseonične vrste u prisustvu superoksid dismutaze mogu da stvaraju vodonik peroksid, koji poput NO difunduje u glatkomišićne ćelije, reaguje sa cisteinskim grupama proteina i menja njihovu funkciju.²⁷ Posledice ovakve aktivacije su fosforilacija transkripcionih faktora, indukcija remodelovanja hromatina unutar gena i aktivacija proteaza.⁴ Superoksidni radikal, O₂⁻ može da reaguje sa NO, pri čemu dolazi do stvaranja toksičnog peroksinitrita ONOO⁻. Na taj način se protektivni efekat azot monoksida gubi i on počinje da se ponaša kao agresivni slobodni radikal.

U patološkim uslovima slobodne radikale može da stvara i eNOS. Ukoliko nema tetrahidbiopterina kao kofaktora ili je L-arginin deficitaran, dolazi do formiranja

superoksida ili vodonik peroksida.¹⁴ Na taj način započinje začarani biohemijski krug, u kome vaskularni protektori postaju generatori slobodnih radikala.

Ukoliko ekspozicija faktorima oštećenja traje duže, dolazi do gubitka antiinflamatornog efekta endotelnih ćelija, njihovog integriteta i prelaska endotelnih ćelija u cirkulaciju.²⁸ Vremenom može da dođe do gubitka endotela čitavog krvnog suda ili do njihovog remodelovanja, sa posledično smanjenom perfuzijom tkiva i razvojem hronične hipoksije. Cirkulišući biomarkeri endotelnog oštećenja su detektovani u perifernim i koronarnim aterosklerotskim lezijama. U ostalim proinflamatornim stanjima koja su, povezana sa vaskularnim oštećenjima kao što su reumatoidni artritis i sistemski lupus,²⁹ mogu se, takođe, otkriti ovi biomarkeri. Smatra se da njihova kvantifikacija može biti rani marker endotelne disfunkcije.

Integritet endotela ne zavisi samo od stepena oštećenja, već i od mogućnosti njegove reparacije. Za sada su opisana dva mehanizma reparacije endotela. Prvi je mogućnost replikacije endotelnih ćelija sa njihovom lokalnom zamenom.³⁰ Drugi je vezan za aktivaciju cirkulišućih endotelnih progenitorskih ćelija i to je alternativni način reparacije endotela.³¹ Ove progenitorske ćelije su primitivne i poreklom su iz kosne srži. Nalaze se u perifernoj krvi i mogu da se diferenciraju u zrele ćelije sa endotelnim karakteristikama.⁴ Ova diferencijacija zavisi od aktivacije NO i delom može biti inhibisana kod osoba koje imaju pozitivne faktore rizika za kardiovaskularne bolesti.³² Rezultati nekih studija pokazali su da fizička aktivnost ili upotreba statina deluju potentno na mobilizaciju progenitorskih ćelija, jer povećavaju bioraspoloživost NO.³³⁻³⁵ Dokazano je i da ove progenitorske ćelije pod uticajem proinflamatornih citokina mogu da se diferenciraju u druge ćelije mijeloidne loze: makrofage i dendritične ćelije, te da na taj način učestvuju u patogenezi vaskularnog oštećenja.³⁶

Pravi modus očuvanja endotelne funkcije leži u održanju vrlo delikatne ravnoteže između ekspozicije faktorima oštećenja i mogućnosti reparacije. Dokazano je da osobe sa većom koncentracijom progenitorskih ćelija imaju bolje očuvanu funkciju endotela. S obzirom na to da su endotelne ćelije najrasprostranjenija struktura u organizmu, njihovo oštećenje je, svakako, u osnovi patogeneze razvoja i progresije kardiovaskularne bolesti, šećerne bolesti i bubrežne disfunkcije.

2.1.5. Endotel kao ciljno mesto oštećenja u bolestima bubrega i kod pacijenata sa transplantiranim bubregom

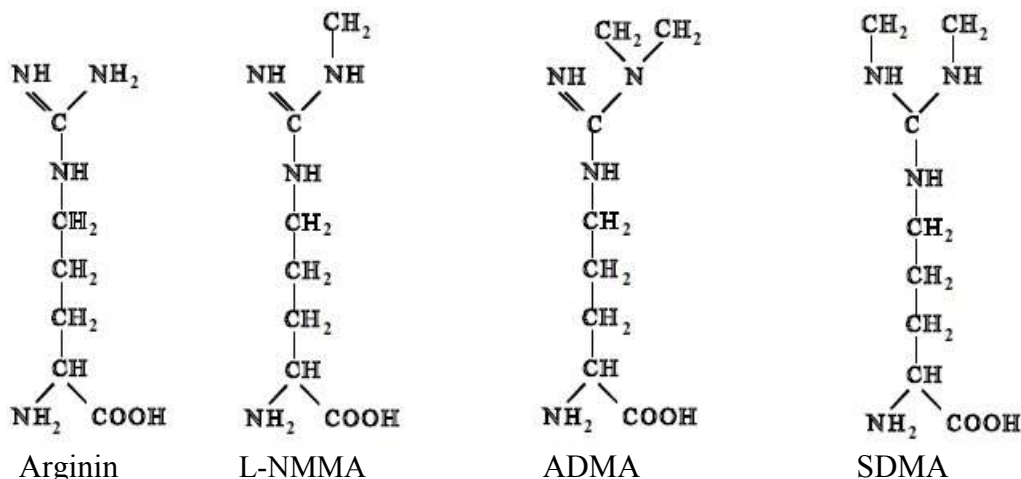
Pacijenti sa primarnom bolešću bubrega, kao i pacijenti u toku samog akta transplantacije bubrega, (ishemijsko-reperfuziono oštećenje) i nakon toga (obavezna trostruka imunosupresivna terapija) predisponirani su za nastanak oštećenja endotela. Ovom oštećenju doprinose i faktori rizika koji se mogu podeliti u tri grupe. Prvu grupu čine klasični ili tradicionalni faktori rizika u koje spadaju: hipertenzija, dislipidemija, pušenje i dijabetes. Druga grupa faktora su netradicionalni faktori rizika i oni su specifični za bubrežnu bolest. To su anemija, sekundarni hiperparatiroidizam i dužina dijaliznog perioda. U treću grupu faktora ubrajaju se: hiperaktivnost simpatičkog nervnog sistema, stimulisana akumulacija endogenog inhibitora eNOS-asimetričnog dimetilarginina (ADMA) i hiperhomocistinemija.³⁷

Postoje egzaktni dokazi koji ukazuju da je endotelna disfunkcija predisponirajući faktor za razvoj komplikacija kod bubrežnih bolesnika po tipu ubrzane ateroskleroze.³⁸ Endotelna NOS i iNOS imaju protektivnu, ali i štetnu ulogu u akutnom i hroničnom odbacivanju kalema.^{39,40}

Kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, endotelna disfunkcija najčešće nastaje usled smanjene sinteze NO,²⁰ što je direktna posledica imunosupresivne terapije i već opisanih faktora rizika.^{41,42} Kod pacijenata sa bubrežnim oštećenjima, kao i kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, endotelna disfunkcija ne samo da ima ulogu u nastanku kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta, već igra i ključnu ulogu u progresiji same bubrežne bolesti. Veliki broj studija je pokazao da je remodelovanje kapilarne mreže medule bubrega, usled endotelnog oštećenja najznačajniji korak ka ishemiji bubrega i progresiji bubrežne slabosti.

2.1.6. Endotelna disfunkcija i poremećaj metabolizma dimetilarginina

Metilarginini su produkti post-translacione metilacije arginina, reakcije posredovane porodicom enzima protein arginin metiltransferaza (PRMT I i II).⁴³ Do danas identifikovani metilarginini su: asimetrični dimetilarginin (ADMA), simetrični dimetilarginin (SDMA) i N-monometil-L-arginin (NMMA), slika 3.



Slika 4. Struktura endogenih metilarginina

Dimetilarginini kao potencijalni medijatori endotelne disfunkcije, hipertenzije i vaskularnog remodelovanja, mogu biti uključeni u patogenezu funkcionalnih i strukturnih oštećenja transplantiranog bubrega.⁴⁴⁻⁵² Kliničke i eksperimentalne studije su pokazale da dimetilarginini imaju ulogu u nastanku vaskulopatije grafta nakon transplantacije srca,⁵³⁻⁵⁷ te se pretpostavlja da imaju isti mehanizam dejstva i kad je bubreg u pitanju.⁵⁸

2.1.6.1. Asimetrični dimetilarginin kao endogeni inhibitor azot monoksida

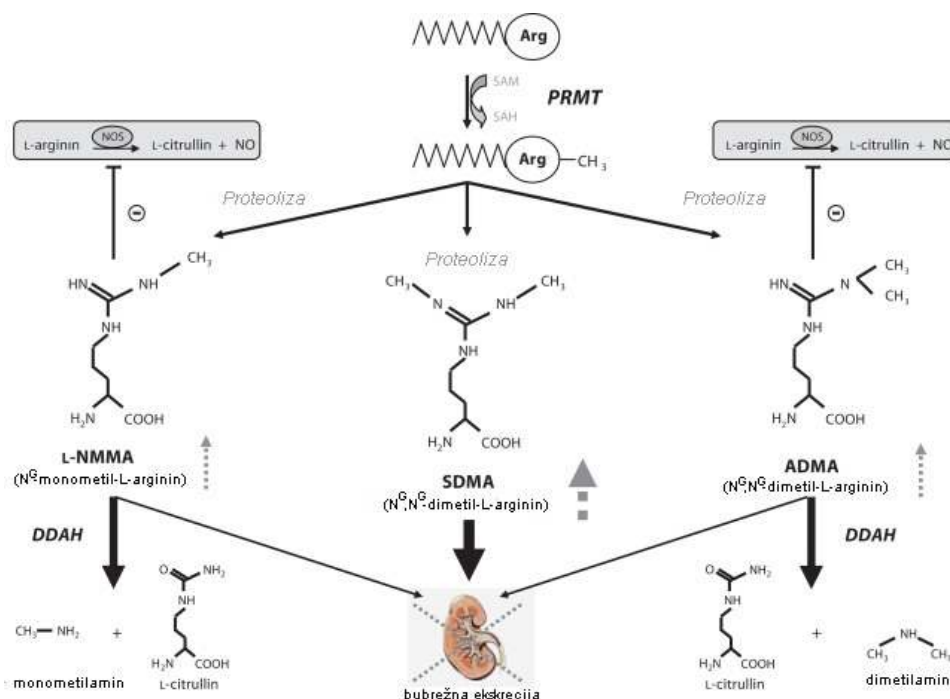
Asimetrični dimetilarginin, ADMA, je derivat arginina koja se normalno sintetise u organizmu u koncentracijama oko 300 μmola ili 60 μg dnevno. Predstavlja snažni kompetitivni endogeni inhibitor za sve tri izoforme NOS, (najsnažniji efekat inhibicije ostvaruje na eNOS). Na taj način ADMA indirekto utiče na sintezu NO i na sve fiziološke procese posredovane azot monoksidom. Molekulska težina joj je 202 daltona, sintetise se intracelularno, recirkuliše u plazmi i biohemijski je relativno stabilan molekul, koji lako difunduje između ćelija. Može se detektovati i u urinu i unutar ćelija.^{59,60}

Asimetrični dimetilarginin nastaje metilacijom proteinskih ostataka, uz katalitičku aktivnost dve izoforme protein arginin metiltransferaza (PRMT I i II).^{61,62} Protein arginin metiltransferaza I direktno učestvuje u sintezi ADME u svim ćelijama u organizmu, kompetitivno deluje prema argininu i blokira NOS. Ekspimirana je u endotelnim,

glatkomišićnim ćelijama i kardiomiocitima. Protein arginin metiltransferaza II pak dovodi do sinteze drugih metilarginina i ne utiče direktno na blokadu eNOS, ali ima kompetitivnu ulogu prema argininu na nivou transportnog sistema Y+. S-adenozilmetionin (SAM) služi kao davalac metil grupe u obe vrste procesa, uz istovremenu transformaciju u S-adenozilhomocistein (SAH), koji nakon hidroksilacije prelazi u homocistein.⁶³ Ekspresija PRMT I u endotelnim ćelijama nastaje usled oštećenja zida krvnog suda ili povišenih vrednosti LDL-holesterola.^{64,65} U humanim endotelnim ćelijama oksidisani LDL i visoke koncentracije “fiziološkog” LDL holesterola dovode do povećane ekspresije gena za PRMT i povećane intracelularne sinteze ADME.⁶⁵ Nakon razgradnje proteina koji sadrže metilisane arginine u plazmi se mogu detektovati slobodne NMMA, ADMA i SDMA. Do danas nije opisan drugi način formiranja ADME iz slobodnog arginina.^{66,67} Razlozi za fiziološku metilaciju arginina su vezani za: 1) regulaciju RNK sinteze; 2) regulaciju procesa translacije; 3) reparaciju DNK; ili 4) interakciju između signalnih proteina translacije.⁵⁹

Količina ADME koja se stvori intracelularno zavisi od metilacije arginina u proteinima (pretežno histona), od kinetike samih proteina, kao i od međusobnog odnosa intra i ekstracelularnih proteina (intracelularni transport L-arginina putem Y+ transportera-katjonski aminokiselinski transporter).^{68,69}

Intracelularna sinteza NO je u bliskoj vezi sa ulaskom u ćeliju ekstracelularnog arginina (intracelularno zahvatanje Y+ transportera sa eNOS) i ekstracelularne ADME, kao antagoniste arginina na nivou transportera.⁷⁰⁻⁷² U endotelnim ćelijama koncentracije ADME su oko 10 puta veće nego njene plazmatske koncentracije.⁷³ Dokazano je da su koncentracije ADME na nivou bubrega i slezine nešto više u odnosu na ostala tkiva,⁷⁴ a intracelularna koncentracija ADME je ključni regulator NOS aktivnosti.⁶⁴



Slika 5. Sinteza i metabolizam dimetilarginina preuzeto iz Boger RH et al.⁵⁰

Do sada opisane uloge ADME se mogu grubo podeliti na efekte koji su NO-zavisni i NO-nezavisni (tabela 1).

Tabela 1. Fiziološki efekat ADME u zavisnosti od aktivnosti azot monoksida preuzeto iz Raptis V et al.⁵¹

NO-zavisni	NO-nezavisni
Inhibiše sve tri izoforme NOS i ekvivalent je L-NMA inhibitorima ^{75,76}	Dovodi do razvoja koronarnih mikrovaskularnih lezija ⁷⁷
Inhibira stvaranje NO putem redukcije stvaranja peroksinitrita (ONOO-) tokom inflamacije u stanjima povećane iNOS aktivnosti ^{78,79}	Dovodi do povećane ekspresije angiotenzin-convertujućeg enzima (ACE) ^{77,80}
U visokim koncentracijama ADMA i NMMA deluju kao antagonisti argininu na nivou Y+ transportnog sistema;	Povećava produkciju superoksida ⁷⁷
Povišene intracelularne koncentracije ADME dovode do smanjenja sinteze eNOS ⁶⁴	
U malim koncentracijama molekuli gvanidina dovode do inhibicije Na-K-ATP-aze u mikrozomima moždanog tkiva ⁸¹	Dozno zavisna inhibicija vaskularnog endotelnog faktora rasta- NO indukovana fosforilacija na Ser 1177 ⁸²
	Dozno zavisna inhibicija vaskularnog endotelijalnog faktora rasta –indukovana ERK1/2 fosforilacija, kinaza za eNOS fosforilaciju ⁸²

2.1.6.2. Intracelularne i plazmatske koncentracije ADME

Precizne intracelularne koncentracije ADME do danas nisu definisane, mada se zna da ćelije imaju mogućnost povećanja koncentracije metilarginina. Dodavanjem metilarginina u medijum za kulturu ćelija, njegova intracelularna koncentracija se može povećati i do pet puta u poređenju sa kontrolom.⁸³ Ovo je verovatno posledica aktivacije transportnih sistema metilarginina, koji koriste i druge aminokiseline arginin, ornitin i lizin.⁸³ Ukupna produkcija ADME na nivou endotelnih ćelija zavisi od ravnoteže između metilacije arginina, razgradnje ADME i njenog izlaska iz ćelija.⁵⁹

Još uvek se ne zna sa sigurnošću da li su svi cirkulišući nivoi ADME biološki aktivni ili su samo marker intracelularnih koncentracija. Na osnovu koncentracija kod zdravih ispitanika, starosti 50 do 75 godina, referentne vrednosti ADME u plazmi, merene *high performance liquid chromatography* (HPLC) metodom,⁸⁴ iznose 0,43–0,56 $\mu\text{mol/l}$, pri čemu su vrednosti u serumu nešto više.⁸⁵ U patološkim stanjima, vrednosti ADME se kreću oko 3 $\mu\text{mol/l}$, što se, po nekim autorima ne smatra dovoljno visokom koncentracijom za biološku aktivnost.^{59,63} Ovo ukazuje da se fokus sada usmerava ka odnosu koncentracija ADME i arginina. Plazmatska koncentracija arginina se kreće između 30 i 100 $\mu\text{mol/l}$, a njegove intracelularne koncentracije između 1 i 2 mmol/l .⁵⁹ Ovako visoki intracelularni arginin hipotetički bi činio ADMU neaktivnom, bez mogućnosti blokade sinteze eNOS-a na nivou identičnog argininskog supstrata. Svakako da bi se ovo odnosilo na arginin koji već postoji u intracelularnom departmanu i koji za intracelularni transport koristi Y+ transporter.⁸⁶

2.1.6.3. Eliminacija ADME iz organizma

Asimetrični dimetilarginin i NMMA se u organizmu uglavnom razgrađuju.⁸⁷ Glavni katabolički put ADME je razlaganje na citrulin i amine (dimetilamin ili monometilamin), posredovan enzimom dimetilarginin dimetilaminohidrolazom-DDAH.⁸⁸ Reakcija uključuje eliminaciju gvanidina iz ADME putem cisteina iz DDAH. Nema sumnje da je cistein aktivna komponenta unutar DDAH, jer njegova zamena serinom čini ovaj enzim inaktivnim.^{88,89} Koncentracija cisteina je regulisana koncentracijama NO i on

je podložan oksidaciji.⁸⁸ Povišene koncentracije NO inhibiraju DDAH aktivnost S-nitrozilacijom aktivne cisteinske komponente i ovaj proces je reverzibilan. Inhibicija DDAH vodi ka porastu nivoa ADME, a posledično i inhibiciji NOS (retrogradna regulacija za održanje ADMA/NO ravnoteže).⁵⁹

DDAH je primarno citoplazmatski enzim i do sada su identifikovana dva gena za njegovu ekspresiju: na hromozomu 1p22 (DDAH-I) i na hromozomu 6p21.3 (DDAH-II). Za DDAH-I izomer za sada je identifikovano osam genetskih polimorfizama, dok je za DDAH-II identifikovano šest genetskih polimorfizama.⁹⁰ Tri od osam polimorfizama za DDAH-I povezano je sa visokim plazmatskim koncentracijama ADME.⁹¹ Iako imaju različitu tkivnu distribuciju, njihova funkcija je gotovo identična (DDAH-I razgrađuje nNOS, a DDAH-II eNOS). Oba izoenzima se u značajnim koncentracijama nalaze na nivou kardiovaskularnog sistema i bubrega, a takođe su izolovani iz neutrofila i makrofaga. Iako se mala količina ADME izluči urinom,⁹²⁻⁹⁴ bubreg ipak, putem DDAH sistema, ostaje najznačajniji organ za njenu eliminaciju.⁶⁴ U humanoj populaciji je procenjeno da se dnevno razgradi oko 250-260 $\mu\text{mol/l}$, a oko 50-60 μmola ADME se elimiše urinom.⁹⁵ U odnosu na koncentraciju ADME koja se razgradi, količina u urinu ne bi trebalo da ima vrednosti više od 20-30 $\mu\text{mol/l}$. U slučaju izraženog smanjenja jačine glomerulske filtracije, očekivalo bi se da dođe do naglog porasta ADME u plazmi (do 5 $\mu\text{mol/L}$). Ovi nivoi pokazuju značajnu stabilnost i vrlo retko prelaze granicu od 3 $\mu\text{mol/L}$.⁹⁵ Ukoliko i dođe do naglih porasta, to je najčešće privremeno i najverovatnije je rezultat prelaska ADME iz ćelija u plazmu.⁵⁹ *In vitro* upotrebom pročišćenog rekombinantnog DDAH-II pokazano je da je razgradnja ADME putem DDAH-II oko 70 puta manja nego DDAH-1.⁹⁶ Smanjenje ekspresije gena za DDAH-II nije imalo nikakav efekat na plazmatske koncentracije ADME, ali je imalo uticaja na relaksaciju endotela. Na genetski modifikovanim miševima pokazano je da je DDAH-I zapravo neophodan za metabolizam ADME i NMMA *in vivo*, dok DDAH-2 nema značajnijeg uticaja na katabolizam pomenutih metilarginina.^{97,98}

Na smanjenje aktivnosti ovog enzima utiču ukupni i oksidisani LDL-holesterol, citokini, hiperglikemija, infektivni agensi i visoke doze eritropoetina, što dovodi do povećanja koncentracije ADMA i smanjene sinteze NO.

2.1.6.4. ADMA u progresiji bubrežnog oštećenja

ADMA bi se definisala kao nekласičan faktor rizika u progresiji bubrežnog oštećenja. Nakon unilateralne nefrektomije pacova administracija ADME u periodu od osam nedelja, dovela je do sledećeg: a) ADMA je bila u pozitivnoj korelaciji sa povišenim oksidativnim stresom, b) nastanka glomerulske (povećana sinteza intravaskularnog matriksa) i vaskularne fibroze, (porast sinteze kolagena tipa I i II i depozicija fibronektina), c) redukcije peritubularne vaskularne kapilarne mreže, d) ekspresije mRNA za kolagen tip I i transformišući faktor rasta $\beta 1$. Eksperimentalno je dokazano da se smanjenjem koncentracije ADMA usporava progresija oštećenja bubrega⁹⁹⁻¹⁰² i da bi ADMA mogla da bude nezavistan prognostički marker za progresiju bubrežne bolesti.^{103,104} Prospektivna studija praćenja pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom pokazala je da visoke vrednosti ADME doprinose smanjenju jačine glomerulske filtracije i razvoju terminalne bubrežne bolesti.¹⁰⁵ Visoke serumske vrednosti ADME su dokazane kao značajni faktor rizika za porast kreatinina dvostruko od referentnih vrednosti kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.¹⁰⁶ ADMA najverovatnije ima uzročnu vezu sa oboljenjima bubrega, mada je to još uvek kontroveržno pitanje, ako se zna da je hronična bubrežna insuficijencija sistemski poremećaj i da je u bliskoj vezi sa mnogim komorbiditetima (insuficijencijom jetre, perifernom vaskularnom bolesti, hipertenzijom, starenjem, dislipidemijom, hiperhomocisteinemijom) i postojanjem njihovih međuzavisnosti. U populaciji pacijenata u terminalnim fazama bubrežne bolesti renalaza je dokazana kao prediktor mortaliteta.^{107,108}

2.1.6.5. Simetrični dimetilarginin

Simetrični dimetilarginin (SDMA) je strukturni izomer ADME i nastaje post-translacionom metilacijom arginina, ali uz učešće PRMT II, takođe uz prisustvo S-adenozilmetionina kao donora metil grupe.²² Zajedno sa ADMOM pripada uremijskim toksinima, ali SDMA, za razliku od ADME nije direktni inhibitor sinteze eNOS. Na nivou endotelnih ćelija kompetitivno se vezuje za aminokiselinski membranski transporter Y+, uslovljavajući deficit arginina i na taj način indirektno smanjuje

produkciju NO.²² Dokazano je da SDMA smanjuje reapsorpciju arginina na nivou Henleove petlje na modelu nefrona pacova. Iz svega pomenutog, kao i podatka da se SDMA u potpunosti elimiše putem bubrega veliki broj istraživača dovodi SDMA u vezu sa bubrežnom disfunkcijom,^{109,110,111} ekskrecijom kreatinina,¹¹² inflamatornim parametrima¹¹³ i mehanizmima koji učestuju u regulaciji krvnog pritiska,¹¹⁴ a predloženo je i da SDMA bude marker kardiovaskularnog oštećenja.^{115,116} Za sada je najizvesnije da bi mogao biti rani biomarker oštećenja bubrega, jer SDMA koncentracije rastu paralelno sa porastom kreatinina. Dokumentovano je da u nekim slučajevima pokazuje veći stepen senzitivnosti u detekciji bubrežne disfunkcije nego sam kreatinin. Nakon totalne nefrektomije pacova dokazan je nagli skok SDMA, sa održavanjem visokih vrednosti oko 48h i porastom koncentracija 20 puta više u odnosu na bazalne nivoe.¹¹⁷ Kako SDMA brže raste u ranim fazama bubrežne bolesti u odnosu na ADMA, smatra se da značajno doprinosi kardiovaskularnom morbiditetu kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom bolešću, ali nije dokazano da je prediktor mortaliteta u ovoj grupi pacijenata. Osim toga, kod životinja hranjenih mastima i holesterolom dolazi do povećanja koncentracije SDMA, bez uticaja na bubrežnu funkciju. SDMA može da učestvuje u patogenezi kardiovaskularnih bolesti i bez oštećenja bubrega.

Sa druge strane visoke vrednosti SDMA su u boljoj korelaciji sa insuficijencijom organa u odnosu na ADMA.

2.1.7. Endotelna disfunkcija, inflamacija i ateroskleroza

Endotelna disfunkcija, posmatrana kroz prizmu poremećaja tonusa krvnih sudova, dešava se mnogo pre strukturnih promena aterosklerotskog tipa i predstavlja nezavisni faktor rizika za buduće kardiovaskularne događaje.¹¹⁸ Oštećenje u najvećem broju slučajeva nastaje nagomilavanjem inflamatornih ćelija u ciljnom organu. Zatim nastaje aktivacija mehanizama koji dovode do ekspresije različitih adhezivnih molekula i hemokina čime se omogućava regrutacija inflamatornih ćelija.¹¹⁹ Ukoliko se ovakve promene dešavaju u miokardu dolazi do razvoja fibroze i dijastolne disfunkcije. Na nivou bubrega, prva manifestacija ovih promena je patološka albuminurija, zatim slede

progresivno strukturalna oštećenja bubrega i bubrežna insuficijencija. Na nivou krvnih sudova razvijaju se aterosklerotske promene.

Endotelne ćelije imaju glavnu ulogu u procesu inflamacije, jer predstavljaju direktnu barijeru između ciljnih tkiva i cirkulišućih inflamatornih ćelija. Inicijalni faktor inflamacije je aktivacija NF- κ B porodice transkripcionih faktora.¹²⁰

Ukoliko je ćelija stimulisana proinflamatornim signalima: citokinima, endotoksinima, modifikovanim lipidima ili reaktivnim kiseoničnim vrstama dolazi do aktivacije NF κ B (vezuje se za promotore različitih gena u jedru) i ekspresije proinflamatornih molekula: ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 (monocitni hemoatraktantni protein-1), IL-6 i mnogih drugih.¹²⁰ Na nivou T-limfocita aktivacija NF κ B dovodi do T-ćelijske aktivacije i polarizacije.¹²¹ Angiotenzin II direktno deluje na T-limfocite i monocite, dovodi do njihove aktivacije, proliferacije i omogućava prodor ka ciljnom organu.¹²² Istovremeno deluje inhibitory na NO i dovodi do produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta, sa povećanjem ekspresije proinflamatornih citokina: IL-6 i MCP-1 i povećanjem ekspresije vaskularnih adhezionih molekula VCAM-1 na endotelnim ćelijama.^{123,124,125} Interleukin-18, (porodica IL-1) kao novoidentifikovani proinflamatorni citokin takođe indukuje ekspresiju adhezionih molekula,¹²⁶ a deluje i hemotaksično na T-limfocite.¹²⁷

Hiperholesterolemija omogućava adherenciju leukocita na endotel,¹²⁸ a oksidisani LDL-holesterol dovodi do aktivacije endotela, smanjujući intracelularne koncentracije NO.¹²⁹ C-reaktivni protein, sintetisan u jetri, takođe dovodi do endotelne disfunkcije smanjenjem produkcije NO i smanjenjem njegove bioraspoloživosti.¹³⁰ Ovakva modifikacija endotela dovodi do hronične inflamacije u zidu krvnih sudova i predstavlja uvod ka razvoju ateroskleroze.

2.1.7.1. Inicijacija i progresija ateroskleroze

Jednom aktivirane endotelne ćelije ekspimiraju selektine, intracelularne i vaskularne celularne adhezione molekule (ICAM-1 i VCAM-1) i omogućavaju adherenciju monocita. Ekspresija adhezionih molekula je indukovana proinflamatornim citokinima IL-1 β , TNF- α , CRP-om, proteaza aktiviranim receptorima, oksidisanim LDL preko oxLDL receptora-1 (LOX-1) i preko interakcije CD40/CD40 liganda (CD40L i

CD154).¹³¹⁻¹³⁵ Adherirani monociti migriraju u tuniku mediju, prolazeći pored endotelnih ćelija i vezuju se preko svojih receptora (CCR2). Ovaj proces direktno zavisi od gradijenta MCP-1.¹³⁶ Kada se nađu u intimi, monociti proliferišu u makrofage i počinju da eksprimiraju “*scavenger*” receptore SR-A, CD36 i LOX-1, koji privlače i “*usisavaju*” modifikovane lipoproteine.^{137,138} Prepunjeni makrofazi ili penaste ćelije, *foam cells*, predstavljaju početak aterosklerotske lezije, koja *de novo* sekretuje proinflamatorne citokine. Ovi citokini zaduženi su za održavanje hemotaktilnog stimulusa za dalje adheriranje leukocita, ekspresiju „*scavenger*“ receptora (nemaju sposobnost regulacijskog sniženja) i promociju replikacije makrofaga.¹³⁹ Pored makrofaga u formiranju ateroma učestvuju i T-limfociti, dendritske ćelije i mastociti.¹³⁹

T limfociti se vezuju za adhezione molekule (VCAM-1) i na taj način lakše ulaze u tuniku intimu, gde aktivirani antigenima (poput ox-LDL) počinju da sekretuju citokine koji pojačavaju makrofagnu aktivnost. CD40/CD40L veza između aktivisanih T limfocita i makrofaga dovodi do ekspresije tkivnog faktora, matriks metaloproteinaza i proinflamatornih citokina, čime se održava već stvoreni inflamatorni milje.¹²⁸ Formacija plaka je dalje pod uticajem mastocita, koji nakon degranulacije, osobađaju TNF- α , heparin i serumske proteaze.¹²⁸

Ukoliko se faktori rizika ne eliminišu, aterom nastavlja progresiju ka mnogo kompleksnijoj leziji, koja podrazumeva proliferaciju glatkomišićnih ćelija, migraciju ka intimi i dalju sintezu kolagena.

2.1.7.2. Celularni adhezioni molekuli

Vaskularni celularni adhezioni molekul-1 (CD 106) i ICAM-1 (CD 54) su adhezioni molekuli sličnih struktura i funkcija. Gen za VCAM-1 sadrži sedam imunoglobulinskih domena i eksprimiran je na svim krvnim sudovima, nezavisno od njihove veličine, ali samo nakon stimulacije endotelnih ćelija citokinima. Produkt ovog gena je sijaloglikoprotein, odnosno membranski protein tip I i član je porodice imunoglobulina, koji se vezuje za leukocitne integrine.¹⁴⁰ VCAM-1, kao transmembranski glikoprotein molekulske težine 100-110 kDa, sastoji se od 750 aminokiselina i ima sedam C2 imunoglobulinskih domena. Osim na endotelnim ćelijama,

ekspimiran je na neuronima, glatkomišićnim ćelijama, fibroblastima i makrofagima. Od bioloških tečnosti izolovan je iz krvi, likvora i supernatanta ćelijske kulture, a svoj fiziološki efekat ostvaruje vezivanjem za VLA-4 i LPAM-1 integrine. Ovi integrini (VCAM-1 ligandi) nalaze se na velikom broju ćelija, a VLA-4 su identifikovani na svim leukocitima, osim na neutrofilima. Interakcija VCAM-1/VCAM-1 liganda nesumnjivo je ključni događaj u procesu ekstravazacije leukocita. Ostale uloge VCAM-1 molekula su u procesu osteoklastogeneze, putem „*cell-to-cell*“ mehanizma i adherencija srpastih ćelija na vaskularni zid tokom hipoksije.

Intracelularni adhezioni celularni molekul-1 je transmembranski glikoprotein, čiji je ključna uloga u migraciji i aktivaciji leukocita, a efekat ostvaruje vezivanjem za leukocitne integrine LFA-1 (CD11a/CD18) ili Mac-1 (CD11b/CD18). Pripada porodici imunoglobulina, nalazi se u veoma niskim koncentracijama na membrani leukocita i endotelnih ćelija. Nakon citokinske stimulacije, koncentracija mu se značajno povećava. Intracelularni adhezioni celularni molekul-1 može biti indukovano pomoću IL-1 i TNF- α , a funkcioniše kao ligand za LFA-1 (integrin) receptor na leukocitima. Nakon aktivacije, leukociti se vezuju za endotelne ćelije preko ICAM-1/LFA-1 i tako migriraju u tkiva. Smatra se da ICAM-1 predstavlja mesto ulaska rinovirusa u humane ćelije, da je glavni medijator I tipa reakcija hipersenzitivnosti, da povećava vazospazam tokom subarahnoidalne hemoragije i drugo. Aktivacija ICAM-1 takođe učestvuje u procesu angiogeneze, zaceljivanju rana i metabolizmu kostiju. Može se detektovati u biološkim tečnostima: serumu, likvoru, urinu i bronhoalveolarnom lavatu. Povišene vrednosti ICAM-1 molekula su zabeležene kod: obolelih od dijabetesa tip 2, kardiovaskularnih bolesti, disfunkciji kalema, oksidativnom stresu, porastu abdominalne gojaznosti, hipertenziji, bolestima jetre i nekim malignitetima. Intracelularni adhezioni celularni molekul-1 promoviše angiogenezu i služi kao indikator aktivacije ili oštećenja endotelnih ćelija.

Više faktora dovodi do zajedničkog porasta adhezivnih molekula: hipertenzija,¹⁴¹ imunosupresivna terapija,¹⁴² autoimune bolesti¹⁴³ i ćelijski posredovano odbacivanje kalema.¹⁴⁴ U eksperimentima na miševima i zečevima obe vrste adhezivnih molekula su ekspimirane na endotelu aorte u regijama predisponiranim za aterosklerozu.^{145,146} Kod hiperholesterolemičnih životinja regulisani su ranom formacijom penastih ćelija, naročito

na periferiji,¹⁴⁵ gde je adhezija monocita maksimalna.¹⁴⁷ Lako se mogu meriti u plazmi ELISA metodom, te na taj način predstavljaju potencijalne biomarkere koji bi ukazali na endotelnu aktivaciju i vaskularnu inflamaciju.¹⁴⁸

2.1.7.3. C-reaktivni protein

C-reaktivni protein (CRP) je prvi otkriveni reaktant akutne faze, sintetisan u jetri. Izgrađen je od 5 identičnih, neglikozilisanih polipeptidnih subjedinica, molekulske mase 115000-140000 daltona. Mehanizam delovanja mu je vezivanje polisaharida iz bakterija, gljivica i parazita, a u prisustvu kalcijuma vezuje i fosfolipide (lecitin) i nukleinske kiseline. Kada se kompleksira postaje aktivator sistema komplementa, a može imati i neke uloge antitela (opsonizacija, fagocitoza ili liza napadnutih ćelija). Fiziološka uloga ovog proteina je u prepoznavanju potencijalno toksičnih autogenih supstanci koje se oslobađaju iz oštećenog tkiva i njihovom vezivanju u cilju detoksikacije ili uklanjanja iz cirkulacije. Veliki broj studija je ukazao da je visoko senzitivni (*high sensitive*) CRP (hsCRP) predstavlja jedan od najznačajnijih nezavisnih prediktora za neželjeni vaskularni događaj^{149,150,151} i značajno doprinosi mortalitetu u kombinaciji sa *Framingham* faktorima rizika.¹⁵² Smatra se da CRP direktno promovira formiranje aterosklerotske lezije i aktivaciju endotelne ćelije.¹⁵³⁻¹⁵⁷ C-reaktivni protein smanjuje transkripciju eNOS-a na nivou endotelne ćelije i "destabilizuje" njihovu mRNK, dovodeći na taj način do smanjenja sinteze NO, u bazalnim i stimuliranim uslovima.¹⁵⁸ Ovaj molekul, takođe, stimuliše oslobađanje endotelina (ET-1) i IL-6, povećava ekspresiju adhezionih molekula, stimuliše MCP-1 i olakšava ulazak LDL-a u makrofage.¹⁵⁹ On olakšava apoptozu endotelne ćelije, a inhibira angiogenezu, povećava aktivaciju endotelne ćelije preko CD14- i deluje stimulatивно na NFκB. Svi ovi efekti CRP-a mogu biti potencirani hiperglikemijom.¹⁵⁴ Osim direktnih efekata na promociju endotelne aktivacije, CRP deluje i indirektno tako što inhibira kosnu srž tokom stimulacije i diferencijacije endotelne progenitorskih ćelija i na taj način sprečava reparaciju endotela. Osim u formiranju plaka, CRP ima ulogu i u njegovom daljem održavanju, dovodeći do povećane ekspresije receptora za angiotenzin I na vaskularnim glatkomišićnim ćelijama (*in vivo i in*

vitro), stimulišući dalju proliferaciju, neointimalnu formaciju i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta.¹⁵³

2.1.7.4. Lipoproteini krvne plazme

Lipoproteini su višekomponentni kompleksi proteina i lipida povezani nekovalentnim vezama. U grupu lipoproteina spadaju: hilomikroni, VLDL (lipoproteini vrlo male gustine), IDL, LDL (lipoproteini male gustine), HDL₂ i HDL₃ (lipoproteini velike gustine). Ukoliko sadrže više lipida zapremina im je veća, a gustina manja, a ako sadrže više belančevima brže se kreću pri elektroforezi i lakše talože pri centrifugiranju. Stabilizovani su nekovalentnim vezama, što omogućava razmenu i prenos pojedinih lipidnih i apolipoproteinskih sastojaka u toku intravaskularnog metabolizma. Glavna uloga im je transport holesterola i triacilglicerola do tkiva, kako resorbovanih, tako i endogeno sintetisanih. Oni su važni za održavanje ćelijskih membrana, jer su donatori holesterola, ali i aktivno učestvuju u njegovom uklanjanju.

2.1.7.4.1. Modifikacija/karbamilacija LDL-holesterola u uremiji

Lipoproteini male gustine (LDL) nastaju u krvnoj plazmi iz lipoproteina veoma male gustine „*very low density lipoprotein*“ (VLDL-a). Predstavljaju naznačajnije nosioce holesterola, odnosno prenose 75% ukupnog holesterola krvne plazme. Javljaju se u pet frakcija (LDL₁₋₅), od kojih je najaterogenija LDL₁, jer ima najduži poluživot. LDL se kataboliše preko svojih ApoB-LDL receptora (sve ćelije osim eritrocita i nervnog tkiva poseduju ove receptore), a u slučajevima povećanih koncentracija u plazmi, LDL biva preuzet od strane makrofaga, preko „*scavenger*“ receptora.

Opisane su izvesne modifikacije ovog lipoproteina kod pacijenata u uremiji, koje značajno doprinose ubrzanoj aterosklerozi. Velikim brojem istraživanja, počevši od ćelijskih kultura, pa do primenjenih kliničkih studija, dokazano je da je karbamilacija proteina biohemijski proces uključen u inflamaciju i patogenezu aterosklerotskog procesa u stanjima hronične uremije. Karbamilacija je proces modifikacije proteina kada izocijanična kiselina (HCNO) reaguje sa terminalnim amino ostacima proteina, npr. lizinom i ovako modifikovani proteini gube svoju fiziološku ulogu. Za njen nastanak

najvažniji faktor je koncentracija ureje u serumu i da bi došlo do karbamilacije proteina, (najčešće lizina i arginina), oni treba da budu deprotonisani. U laboratorijskim uslovima ovaj proces najčešće zahteva prisustvo alkalne sredine i održavanje sobne temperature.



Za sada je dokazana jasna i nezavisna veza između sistemske karbamilacije proteina i koronarne bolesti i rizika za razvoj neželjenog kardiovaskularnog događaja.¹⁶⁰ Karbamilacija proteina dovodi do multiplih proaterogenih bioloških efekata, jer povećava ekspresiju „scavenger“ receptora za LDL, vodeći ka lakšem formiranju penastih ćelija,¹⁶¹ bržem razvoju endotelne disfunkcije i proliferacije glatkomišićnih ćelija. Skorašnje studije nedvosmisleno ukazuju da je karbamilacija proteina katalizovana cijanatom, visoko reaktivnim molekulom, čije su koncentracije povećane usled povišenih vrednosti ureje u plazmi.¹⁶² U ovoj reakciji važnu ulogu igra i leukocitna hem mijeloperoksidaza, koja je povišena u uremijskoj intoksikaciji.¹⁶³ Pretpostavlja se da je renalna disfunkcija najznačajniji trigger faktor, jer porast koncentracije ureje i porast aktivnosti mijeloperoksidaze direktno doprinose ovakvoj modifikaciji proteina. U eksperimentalnim uslovima (nefrektomije ili oralne administracije ureje) *karbamilisani* LDL dovodi do ubrzane ateroskleroze kod miševa hranjenih mastima. Oralna primena ureje uslovljava porast karbamilisanog LDL-a, kod nefrektomisanih pacova, za 8 ili više od 8 puta u odnosu na kontrolu. Uremični miševi imaju značajno više plazmatske koncentracije karbamilisanog LDL-holesterola i značajnije izražene aterosklerotske lezije merene ultrazvukom ili histohemijskom analizom lipidnih depozita. Ovi karabamilisani LDL imaju tendenciju akumulacije u zidu aorte sa ekspresijom ICAM-1 molekula i infiltracijom makrofaga.^{164,165}

2.1.7.4.2. Modifikacija HDL-holesterola ka proinflamatornom molekulu

HDL su lipoproteini velike gustine, sintetišu se u jetri i enterocitima i sadrže tri subfrakcije HDL_C, HDL₂ i HDL₃. Glavni apolipoproteini su AI i AII koji čine 90% ukupnih proteina HDL. Pored ovih HDL sadrže i ApoCI, CII, CIII, D i E. Transformacija HDL holesterola iz nascentnog, diskoidnog oblika u sferičnu česticu podrazumeva učešće enzima lecitin holesterol acil transferaze (LCAT), tako što prima slobodni holesterol, pri

čemu subfrakcija HDL₃ prelazi u HDL₂, koja je veća i sadrži veći procenat lipida. Kada se HDL₂ potpuno zasiti esterifikovanim holesterolom nastaje HDL_C, koji prima ApoE i biva preuzet od strane jetre ili bubrega gde se kataboliše. Na taj način ovi lipoproteini učestvuju u uklanjanju viška holesterola iz ekstrahepatičnih tkiva, a takođe i vraćaju holesterol sa periferije u jetru, gde se koristi za sintezu žučnih kiselina ili se eliminiše.

Tokom epizoda akutne inflamacije HDL doživljava značajnu promenu u svojoj apolipoproteinskoj komponenti i postaje HDL *akutne faze*. Makrofazi imaju povećan afinitet ka ovako izmenjenim HDL molekulima. Promene podrazumevaju još i porast serumskog amiloida A, sekretorne fosfolipaze A, trombocitno-aktivirajućeg faktora acetilhidrolaze, smanjenje apolipoproteina A-I i paraoksonaze-1. Serumski amiloid A se predominantno transportuje HDL-om, a njegovi nivoi se tokom akutne i hronične inflamacije značajno povećavaju. Sličan proces se dešava i u hroničnoj bubrežnoj slabosti.¹⁶⁶ Iz tih razloga pretpostavlja se da HDL ima značajnu ulogu u aterogenezi.¹⁶⁷ Povišena vrednost serumskog amiloida A je prediktor budućih kardiovaskularnih događaja u humanoj populaciji i na modelu miševa.^{167,168} Uremijski miševi imaju značajno veći udeo ovog proinflamatornog proteina u HDL₃.¹⁶⁹

Smatra se i da drugi proteini povezani sa HDL holesterolom učestvuju u procesu aterogeneze. Sekretorna fosfolipaza A2 (takođe povezana sa HDL-holesterolom) i trombocitno aktivirajući faktor acetilhidrolaza (vezana i sa LDL) mogu da imaju značajnu ulogu u procesu aterogeneze kao biomarkeri, ali i kao medijatori.¹⁶⁶ Paraoksonaza-1 ima ateroprotektivni efekat u eksperimentalnom modelu hiperholesterolemije. Međutim, kada su u pitanju pacijenti sa uremijom, dosadašnje studije nisu dokazale njen protektivni efekat ukoliko je kompleksiran sa HDL₃.

2.1.8. Procena endotelne disfunkcije

Endotelno oštećenje se može dokazati kliničkim i laboratorijskim testovima. Klinička evaluacija endotelne disfunkcije se može vršiti na osnovu hemodinamskog odgovora na supstance koje stimulišu produkciju NO (acetilholin) u vaskularnim zonama dostupnim kliničkom pregledu (nadraktica). Invazivna evaluacija endotelne disfunkcije je metoda kvantitativne angiografije sa intrakoronarnom infuzijom serotonina ili

bradikinina. Ona omogućava direktnu kvantifikaciju endotelne funkcije koronarnih krvnih sudova. Metoda predstavlja zlatni standard za ranu detekciju ateroskleroze koronarnih arterija, ali je invazivna, rizična i skupa i ne može se koristiti kao skrining metoda u populaciji pacijenata sa bubrežnom bolešću.

Ultrazvučno merenje dilatacije brahijalne arterije ili „*flow mediated dilatation*“ je neinvazivna metoda, koja daje direktni uvid stanja koronarnih krvnih sudova i može se koristiti i kod pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne bolesti. Ostale neinvazivne metode su: pletizmografija, tonometrija, laser dopler floumetrija i jontoforeza.

Biohemijska evaluacija endotelnog oštećenja je u svakodnevnom radu dostupnija i za pacijente komfornija. Moguće je meriti koncentracije solubilnih biomarkera u biološkim tečnostima (najbolje u plazmi) koje ukazuju na stepen endotelnog oštećenja, odnosno na dugotrajnu izloženost endotela faktorima rizika. To su: markeri koagulacije i fibrinolize (PAI-1, tkivni aktivator plazminogena, von Wilebrandov faktor). Zatim adhezioni molekuli (ICAM-1 i VCAM-1 i endotelni selektini) i parametri lipidnog statusa (ukupni holesterol, lipoproteinske frakcije, koncentracija triglicerida i sl). Mogu se meriti i parametri nitrozativnog stresa (koncentracija ADME, SDME, nitrita, arginina), kao i markeri inflamacije niskog stepena (CRP, IL-1, IL-6, TNF- α) i drugo. Potencijalni biomarkeri za evaluaciju endotelne disfunkcije su: *endotelijalne mikropartikule*, markeri endotelnog oštećenja mereni floucitomrijom (kao marker subkličke ateroskleroze). Kod pacijenata sa početnim stadijumom bubrežne bolesti od potencijalne važnosti je određivanje i parametara kao što su: *pentraksin 3*, *leptin*, *visfatin*, *osteoprotegrin* i *endotelijalne progenitorske ćelije*.

Hemodinamski i biohemijski markeri endotelne disfunkcije ukazuju na različite aspekte endotelne patofiziologije, tako da je u cilju prevencije, sprečavanja progresije i neželjenih efekata neophodno njihovo detaljno i pravovremeno prepoznavanje i tumačenje.

2.2. Imunosupresivna terapija

Prvi pokušaji transplantacije bubrega datiraju još od dvadesetih godina prošlog veka, ali era transplantacione medicine započinje pedesetih godina, uspešnom

transplantacijom bubrega kod jednojajčanih blizanaca. Sredinom šezdesetih godina, po prvi put, u posttransplantacioni protokol lečenja uvedena je imunosupresivna terapija azatioprinom, a ubrzo nakon toga i prednisonom, da bi se sedamdesetih godina krenulo i sa upotrebom poliklonalnih antitela (antitimocitnog i antilimfocitnog globulina). Imunosupresivi su povećali stopu preživljavanja pacijenata, tako da ona nakon prve godine iznosi oko 50%.

Ključni trenutak u praćenju pacijenata nakon transplantacije organa vezan je za otkriće kalcineurinskih inhibitora, ciklosporina, tako da je osamdesetih godina standardni terapijski protokol uključivao kortikosteroide, azatioprin i ciklosporin. Ubrzo se otkrilo da ciklosporin, osim imunosupresivnog efekta, ima i snažno nefrotoksično dejstvo. Novi lek koji je devedesetih godina uključen u imunosupresivni protokol bio je takrolimus. Prvo je korišćen kod pacijenata sa transplantiranom jetrom, a nakon toga i kod transplantacije bubrega. Takrolimus je predstavljen kao alteranativa ciklosporinu, sa istim farmakološkim dejstvom, a sa manje neželjenih efekata. Ubrzo i azatioprin dobija alternativu, u vidu mikofenolat mofetila, ali sa boljim efektom i smanjenjem incidencije akutnih epizoda odbacivanja.

Poslednji značajan lek odobren od strane *Food and Drug Administration* (FDA) i uveden u kliničku praksu je mTOR (*mamalian target of rapamycin*) inhibitor, sirolimus (US), odnosno everolimus (Evropa). Od 2009. veliki broj kliničkih studija je u toku, u Americi i Evropi, sa ciljem ispitivanja novih imunosupresivnih protokola.

Najznačajnija imunološka struktura na koju se deluje u cilju imunosupresije je T-limfocit. Ova terapija deluje na mehanizam njegove aktivacije i ćelijske proliferacije; radi se o „*tro-signalnom modelu*“. Signal 1 je antigen prezentujući, koji nastaje aktivacijom receptora na T limfocitima od strane antigen prezentujućih ćelija i sprovodi se preko CD3 kompleksa. Signal 2 je antigen prezentujući kostimulatorni signal dobijen preko B7 na antigen prezentujućim ćelijama sa CD28 na T-limfocitima. Ova dva signala aktiviraju intracelularni put, koji vodi do ekspresije IL-2 i ostalih citokina, sa učešćem u promociji rasta. Stimulacija IL-2 receptora omogućava aktivaciju signala 3 i aktivaciju mTOR što stvara signal 3, koji je znak za ćelijsku proliferaciju.

2.2.1. Kalcineurinski inhibitori-ciklosporin i takrolimus

Termin „kalcineurinski inhibitori“ (KNI) se koristi kada se govori o ciklosporinu ili takrolimusu, lekovima koji čine okosnicu modernih imunosupresivnih protokola. Iako se biohemijski radi o dva potpuno različita molekula, vrlo su im slični mehanizam delovanja, klinički efekti i neželjena dejstva.

Ciklosporin je mali ciklični polipeptid poreklom iz gljivica. Sastoji se od 11 aminokiselina, molekulske težine od 1203, nerastvorljiv je u vodi, ali se dobro rastvara u mastima i organskim rastvaračima. Amino kiseline na 1. 2. i 3. i 11. poziciji čine aktivno mesto, ali je zapravo ciklična struktura molekula odgovorna za njegov imunosupresivni efekat. Takrolimus, ili FK506, je komponenta makrolidnih antibiotika izolovana iz aktinobakterije *Streptomyces tsukubaensis*.

Osnov farmakološkog mehanizma KNI je sposobnost selektivne inhibicije imunskog odgovora i odsustvo mijelosupresije. Istovremeno su bez dejstva na polimorfonuklearne leukocite i ne smanjuju sposobnost fagocitoze (kao što je to slučaj sa kortikosteroidima). Njihov imunosupresivni efekat zavisi od formiranja kompleksa sa receptorima citoplazmatskih proteina, ciklofilinom za ciklosporin i takrolimus vezujućim proteinom (FKBP). Ovaj kompleks se vezuje sa kalcineurinom, koji deluje kao fosfataza sa efektom defosforilacije izvesnih regulatornih proteina unutar jedra (nuklearni faktor aktivacije T-limfocita) i olakšava njihov prolazak kroz jedarnu membranu. Inhibicija kalcineurina smanjuje ekspresiju gena nekoliko bitnih citokina koji promovišu aktivaciju T ćelija, uključujući IL-2, IL-4, interferon- γ (IFN- γ) i faktor nekroze tumora- α (TNF- α). Ova blokada utiče i na ekspresiju drugih gena, CD40 liganda, proto-onkogeno H-ras i c-myc. Kao rezultat kalcineurinske inhibicije javlja se kvantitativno smanjenje produkcije citokina, kao i njihova smanjena proliferacija.

Ciklosporin utiče i na ekspresiju transformišućeg faktora rasta- β (TGF- β), koji inhibira ekspresiju IL-2 i stvaranje citotoksičnih T-limfocita. Moguće je da on ima uticaj na razvoj intersticijske fibroze, što je najznačajnija posledica nefrotoksičnosti indukovane ciklosporinom. *In vivo* efekti ciklosporina se blokiraju dodavanjem anti-TGF- β faktora, te se zato pretpostavlja da je zapravo TGF- β glavni medijator u nastanku svih efekata kalcineurinskih inhibitora. TGF- β je označen i kao bitan faktor u proliferaciji tumorskih ćelija, sa značajnim učešćem u razvoju post-transplantacionog maligniteta.

Kod stabilnih pacijenata na terapiji ciklosporinom, CD4+T-ly smanjuju produkciju IL-2 do nivoa koji je obrnuto proporcionalan nivou leka u plazmi. Nivo inhibicije kalcineurinske aktivnosti i inhibicije produkcije IL-2 je verovatno osnova vrlo delikatne ravnoteže između subdoziranja i pravilnog doziranja leka. Nakon oralne upotrebe trećina ciklosporina se u plazmi vezuje za lipoproteine, ostatak leka se vezuje za eritocite, pa je ukupan nivo leka u krvi trostruko viši nego u plazmi. Vezivanje za lipoproteine je važno zbog transfera leka preko plazmatskih membrana, pa toksičnost može biti potencirana hipoholesterolemijom. Vezivanje ciklosporina za LDL lipoproteinske receptore je najverovatniji uzrok nastanka hiperlipoproteinemije koja se javlja kod ovog vida terapije.

Takrolimus takođe pokazuje visok afinitet vezivanja za uobličene elemente krvi, ali se razlikuje od ciklosporina po tome što se ne prenosi striktno lipoproteinima i ne menja značajno lipidni status u poređenju sa ciklosporinom. U tabeli 2 prikazane su najosnovnije razlike između neželjenih efekata ovih lekova. Vreme eliminacije oba leka je oko 8h, a metabolišu se putem citohrom P-450 IIIA (CYP3A), izolovanog iz mikrozomalnog sistema gastrointestinalnog trakta i jetre. Metabolizam na nivou gastrointestinalnog trakta preko CYP3A i p-glikoproteina čini „*first pass*“ metabolizam, a heterogenost genske ekspresije intestinalne CYP3A bi mogla da objasni različitosti u farmakokinetici kod različitih pacijenata. Jetra se smatra najznačajnijim mestom njihovog metabolizma, iako se oko 50% leka metaboliše zapravo u enzimskom sistemu gastrointestinalnog trakta. Metabolizam takrolimusa na nivou creva je takođe vrlo značajan. Oba leka se eliminišu putem žuči uz minimalnu eliminaciju putem urina, te se mogu davati i pacijentima sa bubrežnom insuficijencijom, a zbog toga i u slučajevima pogoršanja bubrežne funkcije nije neophodna modifikacija terapijske doze. Mogu se koristiti i kod pacijenata koji se leče dijalizom, jer ne prolaze dijaliznu membranu. Farmakokinetika kalcineurinskih inhibitora se značajno razlikuje u zavisnosti od starosti, etničke pripadnosti ili insuficijencije jetre i u ovim slučajevima neophodne su modifikacije doza. Postoji i veza između plazmatskih koncentracija leka i epizoda odbacivanja kalemata ili toksičnosti. Iz tog razloga praćenje koncentracija leka iz pune krvi je od velike važnosti.

Tabela 2. Karakteristike i neželjena dejstva kalcineurinskih inhibitora, preuzeto iz Danovitch GM¹⁷⁰

Karakteristika leka	Ciklosporin A (3-5 mg/kg/dan)	Takrolimus (0,15-0,3 mg/kg/dan)
Sposobnost sprečavanja odbacivanja kalema	+	++?
Nefrotoksičnost	+	+
Hipertenzija i retencija natrijuma	++	+
Toksičnost pankreasa	+	++
Neurotoksičnost	+	++
Hirzutizam	+	-
Alopecija	-	+
Hipertrofija desni	+	-
Gastrointestinalni neželjeni efekti	-	+
Motilitet želuca	-	+
Hiperkalijemia	+	+
Hipomagnezijemia	+	+
Hiperholesterolemija	++	-
Hiperurikemija, giht	+	+

+, dokazani efekti; ++ izraženi efekti; ++?,verovatno izraženi efekti; -, bez efekata ili slabiji efekat

2.2.1.1. Patofiziološki efekti kalcineurinskih inhibitora

Nefrotoksičnost je najznačajniji neželjeni efekat imunosupresivne terapije. KNI dovode do dozno-zavisne reverzibilne renalne vazokonstrikcije, koja pretežno zahvata aferentnu arteriolu, tabela 3. Koeficijent glomerulske ultrafiltracije (Kf) se smanjuje, što je verovatno rezultat povećane kontraktilnosti mezangijalnih ćelija.

Normalna regulacija glomerulske mikrocirkulacije zavisi od procesa ravnoteže vazokonstrikcije i vazodilatacije. Vazokonstrikcija indukovana ciklosporinom je uzrokovana promenom metabolizma arahidonske kiseline, sa posledičnim povećanjem sinteze tromboksana. Dokazano je i da je ciklosporin induktor sinteze endotelina, što takođe utiče na proces vazokonstrikcije (endotelin zavisna vazokonstrikcija). Brojne studije su dokazale i povišen tonus simpatičkog nervnog sistema tokom terapije ciklosporinom. Hemodinamske promene na nivou glomerula indukovane ciklosporinom mogu biti reverzibilne, upotrebom inhibitora endotelina ili antiendotelinskih antitela.

Tabela 3. Sindromi nefrotoksičnosti indukovane kalcineurinskim inhibitorima preuzeto iz Danovitch GM¹⁷⁰

Značajna disfunkcija kalema nakon transplantacije
Akutno reverzibilno smanjenje glomerulske filtracije
Akutna mikrovaskularna bolest
Hronično neprogresivno smanjenje glomerulske filtracije
Hronično progresivno smanjenje glomerulske filtracije
Hipertenzija i elektrolitni disbalans
Retencija natrijuma i edemi
<ul style="list-style-type: none"> • Hiperkalijemia • Hipomagnezijemija • Hiperhloremijska acidoza
Hiperurikemija

Nekoliko *in vivo* i in *in vitro* studija je dokazalo da promena odnosa L-arginin/NO ima ulogu u patogenezi kalcineurinski indukovane vazokonstrikcije. NO dovodi do relaksacije arterija pre ulaska u glomerul i na taj način poboljšava dotok krvi. Konstitutivna NOS se stvara na nivou bubrežnih endotelnih ćelija i učestvuje u modulaciji vaskularnog tonusa. Smatra se da akutna i hronična ciklosporinska nefrotoksičnost može biti potencirana inhibicijom NOS-a, putem njenih endogenih blokatora i popravljaju se administracijom L-arginina.

Kalcineurinskim inhibitorima indukovana bubrežna vazokonstrikcija klinički se manifestuje kao odložena funkcija grafta ili kao reverzibilan, dozno-zavisan, porast kreatinina u plazmi. Verovatno je najznačajniji patogenetski faktor za retenciju natrijuma i nastanak hipertenzije. Retencija natrijuma i hipertenzija nastaju usled vazokonstriktornog delovanja KNI na nivou bubrega, naročito tokom ciklosporinske terapije (hipertenzija i pojava edema). Neke od studija su pokazale značajnu aktivaciju sistema renin angiotenzin aldosteron i simpatičkog nervnog sistema, kao i supresiju lučenja atrijalnog natriuretskog faktora, posledično smanjenje natriureze i diureze kao odgovor na akutno povećanje volumena tečnosti. Smatra se da je hipertenzija manje izražena kod pacijenta na takrolimusu, (ili je potrebna manja doza antihipertenziva), najverovatnije usled slabijeg vazokonstriktornog efekta.

Hiperkalijemija je relativno česta pojava i udružena je sa hipohloremijskom acidozom umerenog stepena i nemogućnošću eliminacije H⁺ (klinički imponuje IV tipu

renalne tubulske acidoze). Kalcineurinski inhibitori dovode do većeg izlučivanja Mg^{2+} i Ca^{2+} što je posledica "down"-regulacije specifičnih transportnih proteina.

Intersticijska fibroza nastaje zbog oštećenja arteriola usled hronične upotrebe KNI. Još uvek nisu potpuno razjašnjeni mehanizmi njenog nastanka, mada se smatra da adekvatno doziranje leka može, uz mala variranja, da održi bubrežnu funkciju dugi niz godina. U nastanku hronične ciklosporinske nefropatije kalema verovatno određenu ulogu imaju i angiotenzin zavisni regulatorni molekuli koji su neophodni za proces oživljavanja, kao što su TGF- β i osteopontin. Povećana produkcija TGF- β u normalnim T-ly može da objasni vezu imunosupresivnog efekta kalcineurinskih inhibitora i nefrotoksičnosti, kao i varijacije u ekspresiji gena za fibrin. Hipomagnezijemija dovodi do intersticijske inflamacije i povećava produkciju TGF- β , ubrzavajući tako nastanak fibroze. Intersticijska fibroza može da nastane i usled prolongirane vazokonstrikcije na nivou mikrocirkulatorne mreže u bubregu. Ciklosporin smanjuje regenerativni potencijal mikrovaskularnih endotelnih ćelija i indukuje apoptozu. Hronična bubrežna ishemija dovodi do značajne sinteze i akumulacije ekstracelularnog matriksa unutar intersticijuma. Akutna mikrovaskularna bolest ili trombotička mikroangiopatija je KNI indukovana forma vaskularne toksičnosti i može biti lokalna (samo na nivou bubrega) i sistemska. Javlja se kao sindrom koji klinički podseća na trombotičnu trombocitopenijsku purpuru, sa sintezom antitela na von Willebrand factor (vWF)-proteazu ADAMTS13 i cink metaloproteazu. Ciklosporin *in vitro* dovodi do porasta adenzin difosfatom-indukovane agregacije trombocita, stvaranja tromboplastina i povećanja aktivnosti VII faktora koagulacije, a istovremeno smanjuje produkciju endotelijalnih prostaciklina. Smatra se da su ovo patogenetski mehanizmi odgovorni za nastanak mikrotromboembolija u glomerulima.

Terapija ciklosporinom je jedan od najznačajnijih faktora koji dovode do hiperlipidemije kod pacijenata nakon transplantacije. Patogenetski mehanizmi odgovorni za nastanak hiperlipidemije su najverovatnije vezani za neadekvatnu LDL lipoproteinsku "feed-back" kontrolu od strane jetre, izmenjeni metabolizam žučnih kiselina ili pak aktivaciju LDL receptora pod uticajem ciklosporina. Trećina pacijenata nakon transplantacije razvije "de novo" hiperholesterolemiju u prvoj godini nakon operacije. Ovaj efekat je manje izražen kod pacijenata koji su na terapiji takrolimusom. Razvoj

posttransplantacione šećerne bolesti je takođe opisana komplikacija ove terapije, jer KNI (predominantno takrolimus) deluju toksično na ostrvca pankreasa, najverovatnije usled nagomilavanja FKBP (FK506 binding protein). Posledično nastaje vakuolizacija ćelija pankreasa i apoptoza. Favorizujući faktori za razvoj ovog tipa šećerne bolesti su gojaznost, pozitivna porodična anamneza, etnička pripadnost i hepatitis C.

2.2.2. Mikofenolat mofetil i mikofenolična kiselina

Mikofenolična kiselina je fermentisani produkt nekoliko penicilinskih vrsta i farmakološki efekat postiže reverzibilnom inhibicijom inozin monofosfat dehidrogenaze (IMPDH). Ovo je enzim u *de novo* sintezi purina, koji katalizuje stvaranje guanozinskih nukleotida iz inozina. Mikofenolat mofetil (MMF) je u kliničkoj upotrebi od 1995. godine nakon što je dokazano da je mnogo efekasniji od azatioprina u prevenciji akutnih epizoda odbacivanja grafta u kombinaciji sa ciklosporinom i kortikosteroidima. Ostvaruje selektivni antiproliferativni efekat na limfocite, (limfociti više nego bilo koja druga ćelijska forma imaju "salvage" put za produkciju guanozinskih nukleotida iz guanina). Na taj način deluje kao "antimetabolit" i ima potpuno drugačiji mehanizam delovanja od KNI ili mTOR inhibitora, s obzirom da ne utiče na produkciju citokina ili prepoznavanje antigena. *In vitro*, MMF blokira proliferaciju T i B limfocita, sprečava stvaranje antitela i stvaranje citotoksičnih T limfocita. Takođe dovodi do „down“ ekspresije adhezivnih molekula na limfocitima, onemogućavajući im da se vežu za endotelne ćelije krvnih sudova sprečavajući inflamaciju. On deluje preventivno na razvoj i progresiju proliferativne arteriolopatije, najznačajnije patološke lezije u hroničnom odbacivanju grafta. Dosadašnji rezultati primene MMF nisu pokazali nefrotoksičnost, neurotoksičnost i hepatotoksičnost. Važno je da se ne metaboliše putem CYP-450 enzimskog sistema, tako da ne interferira sa KNI.

2.2.3. Imunska modulacija i indukcija imunotolerancije

Imunska modulacija je termin koji objašnjava pokušaj modifikacije imunskog odgovora bez uticaja na efektorske ćelije ili mehanizme. Nju čine infuzija donor-specifične kosne srži ili stem ćelija i totalna limfoidna iradijacija u kombinaciji sa kratkotrajnom nespecifičnom imunosupresijom. Ova tehnika je u eksperimentalnim uslovima omogućila preživljavanje grafta u odsustvu klasične imunosupresivne terapije, ali se smatra da je klinička primena ovakvih procedura još uvek pod velikim znakom pitanja.

2.3. Simpatički nervni sistem u bolestima bubrega

Veći broja studija je dokazao povećanu aktivnost simpatičkog nervnog sistema (SNS) kod pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne bolesti,¹⁷¹ koja je u korelaciji sa porastom krvnog pritiska i perifernog otpora.¹⁷² Tačna patogeneza ove hiperaktivacije nije dovoljno razjašnjena. U zadnje tri decenije je objavljeno preko 35000 publikacija koje su ukazale na aktivaciju simpatikusa, kao značajnog kardiovaskularnog faktora rizika, ali i patogenetskog mehanizma odgovornog za oštećenja ciljnih organa.

Smatra se da je bubrež primarno mesto ove aktivacije, putem svojih aferentnih nerava, jer je dokazano da je simpatička stimulacija odsutna u stanjima totalne nefrektomije.¹⁷² Bubrezi su organi sa vrlo gustom mrežom simpatičkih, aferentnih i eferentnih nervnih vlakana, zato se pretpostavlja da su istovremeno generatori, ali i ciljno mesto oštećenja, usled prevelike aktivacije simpatikusa. Ova hiperaktivnost se smanjuje nakon uspešne transplantacije, ali se ne normalizuje u potpunosti.¹⁷³ Osim toga, pretpostavlja se, da u stanju hronične uremije, stimulacija bubrežnih hemoreceptora mnogobrojnim toksinima i metabolitima, dovodi do aktivacije perifernih nerava, koji aferentim putem dolaze do centralnog nervnog sistema, rezultujući povećanjem tonusa simpatičkog sistema. Ovakva aktivacija je zapravo jedan od prvih patofizioloških mehanizama u razvoju hronične bubrežne bolesti i nije posledica njene terminalne faze.^{172,173} Pomenuti mehanizmi značajno doprinose patogenezi kardiovaskularne bolesti kod pacijanata sa bubrežnom bolešću i direktni su krivci za lošu prognozu ovih pacijenata.¹⁷¹ Povišene koncentracije cirkulišućih kateholamina i povećana osetljivost na

noradrenalin su prvi pokazatelji aktivacije simpatikusa kod pacijenata sa hroničnom bolešću bubrega.^{174,175} Povišen nivo kateholamina u plazmi nije samo rezultat njihovog smanjenog klirensa, hiperkateholaminemija zapravo nastaje usled preklapanja nekoliko različitih patofizioloških mehanizama koji dovode do smanjenog biološkog efekta azot monoksida, porasta koncentracije angiotenzina II i povećane aferentne signalizacije od strane bolesnog bubrega.¹⁷⁶ Klirens noradrenalina je smanjen za oko 20% u ranim stadijumima bubrežne slabosti, pa do 40% kod pacijenata koji su na dijalizi.¹⁷⁷ Noradrenalin stimulacijom receptora eksprimiranim na kardiomiocitima dovodi do hipertrofije leve komore.¹⁷⁸ Ovako prevelika stimulacija simpatikusa i gotovo potpun izostanak efekta vagusa dovodi do poremećaja srčanog ritma,¹⁷⁸ što dovodi do iznenadne srčane smrti, najčešćeg uzroka mortaliteta pacijanta sa HBI.¹⁷⁹ Sposobnost kateholamina da interferiraju sa metabolizmom lipida i utiču na sintezu holesterola još je jedan od mogućih mehanizama kojima su kateholamini uključeni u patogenezu kardiovaskularnih komplikacija. Ostali predloženi mehanizmi su:

- promena ritma ventilacije i stanje hronične intermitentne hipoksije praćeni aktivacijom hemoreceptora
- porast osmolalnosti plazme, sa aktivacijom hipotalamičkih vazopresornih signala
- vaskularna inflamacija moždanog stabla
- simpatička aktivnost posredovana angiotenzinom II
- modifikacija odnosa pritisak/natriureza usled prevelike simpatičke stimulacije od strane bubrega

Aktivacija simpatikusa na nivou bubrega pre svega dovodi da stimulacije RAA sistema i retencije natrijuma i tečnosti, sa dodatnim zadržavanjem vode. Smatra se da ova adrenergička hiperaktivnost i bubrežna disfunkcija zavise, osim nivoa kateholamina i od plazmatskih koncentracija endogenog asimetričnog dimetilarginina, ADME, kao markera endotelnog oštećenja i mase leve komore. Međutim, još uvek nije u potpunosti dokazana veza ovih varijabli, niti koliki je nivo aktivnosti simpatikusa neophodan za oštećenje ciljnih organa.

Amino oksidaze su enzimi koji metabolišu kateholamine i klasifikovani su prema tome koju aktivnu komponentu poseduju kao kofaktor. Za sada su identifikovane dve klase monoamino oksidaza: MAO-A i MAO-B, koje kao kofaktor sadrže flavin adenin

dinukleotid (FAD). To su mitohondrijalni enzimi koji metabolišu intracelularne kateholamine, tako da su odgovorni samo za njihove unutarćelijske koncentracije. Ovi enzimi (MAO-A i MAO-B) katabolišu neurotransmitere: adrenalin, noradrenalin, serotonin i dopamin i mogu se inhibisati clorgilinom i deprenilom. Poliamino oksidaza, takodje sadrži FAD kao kofaktor i intracelularna je oksidaza koja metaboliše spermidin i spermin i učestvuje u ćelijskom rastu. S obzirom da su navedeni enzimi intracelularne lokalizacije, nametnulo se pitanje identifikacije enzima koji je u stanju da utiče na promenu nivoa kateholamina u telesnim tečnostima.

2.3.1. Identifikacija i karakterizacija renalaze

Bubreg je organ višestrukih funkcija. Osim ekskretorne, funkcije održanja volumena cirkulišuće tečnosti i elektrolita i uloge u regulaciji acido-bazne ravnoteže, bubreg je i značajan endokrini organ. Prvi otkriveni hormon, sintetisan od strane jukstaglomerularnog aparata bio je renin, zatim je otkriven eritropoetin, da bi se potom dokazalo da je bubreg mesto stvaranja aktivne forme vitamina D₃, kalcitriola. Bubrezi osim pomenutih hormona sintetišu i luče i različite prostaglandine i druge manje biomolekule sa sistemskim efektom održanja vaskularnog tonusa. Od 2005. godine, otkriveno je da je bubreg mesto sekrecije novog enzima (hormona), FAD-zavisne aminooksidaze, nazvanog renalaza.¹⁸⁰ Pretpostavljeno je da bi renalaza, kao glavni enzim koji učestvuje u katabolizmu kateholamina, mogla da ima ključnu ulogu u regulaciji tonusa simpatikusa i regulaciji krvnog pritiska¹⁸⁰ i od svog otkrića predstavlja značajno mesto istraživanja u studijama koje se bave regulacijom aktivacije simpatičkog nervnog sistema. Identifikacija i karakterizacija renalaze je ilustrativan primer primene novih biotehnologija: genomike i proteomike.

Renalaza je identifikovana kao FAD-zavisna monoamino oksidaza, pri čemu je FAD esencijalni kofaktor odgovoran za stabilnost molekula i njegovu oksidaznu aktivnost.¹⁸⁰ Gen za renalazu je lociran na 10 hromozomu, q23.33, sadrži sedam egzona, sastoji se od 342 aminokiseline i molekulska masa joj je 38kDa. Iako pripada grupi monoamino oksidaza, renalaza poseduje samo 13%, odnosno 12% identičnog aminokiselinskog niza kao MAO-A i MAO-B.¹⁸⁰ Izolovano je je 4 podtipova renalaze (1-

4), od kojih je najbolje proučena humana renalaza, *hrenalaza1*, sa najvećim stepenom bioraspoloživosti. dobrom konzervacijom kroz evoluciju, sa 95% identičnosti u sastavu amino kiselina u poređenju sa šimpanzom i 23% identičnosti kao cyanobacteria. Iako *hrenalaza 3 i 4* nisu dovoljno proučene, smatra se da nemaju enzimsku aktivnost, usled značajno skraćenih amino oksidaznih domena. Kao signalni peptid sadrži flavin adenin dinukleotid/nikotinamid adenin dinuklotid, redukovani (FAD/NADP) vezujući domen i aminooksidazni domen.¹⁸¹

Glavno mesto sekrecije renalaze je bubreg (predominantno proksimalni tubuli, sa tkivnom koncentracijom, merenom Western blot tehnikom, 0.1 mg/g tkiva), mada se može sekretovati i na nivou nefrona i distalnih tubula, kao i na nivou kardiomiocita, jetre i skeletne muskulature.¹⁸⁰ Kasnije je dokazana ekspresija i u drugim tkivima: perifernim nervima, nadbubregu, masnom tkivu, endotelnim ćelijama, centralnom nervnom sistemu i fetusu starosti 12,5 dana.^{182,183} Western blot metodom i *polymerase chain reaction* (PCR) analizom humanog tkiva otkrivena je i ekspresija gena za renalazu u hipotalamusu, ponsu, produženoj moždini, cerebelumu, hipofizi i kičmenoj moždini.¹⁸² Uzevši u obzir činjenicu da je kod pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne bolesti, na dijalizi i u eksperimentalnom modelu subtotalne (5/6) nefrektomije pacova nivo renalaze veoma nizak, čak i nemerljiv, zaključuje se da je intaktan bubreg glavno mesto sekrecije i regulacije nivoa ovog hormona u plazmi.¹⁸⁰ Renalaza je jedina monoaminoksidaza koja se sekretuje u krv i eliminiše urinom. Zahvaljujući mogućnosti da se meri u biološkim tečnostima, renalaza bi mogla da bude potencijalni biomarker promena kardio-nefrološke lokalizacije. Za sada još uvek nema referentnih vrednosti o aktivnosti renalaze u serumu ili urinu.

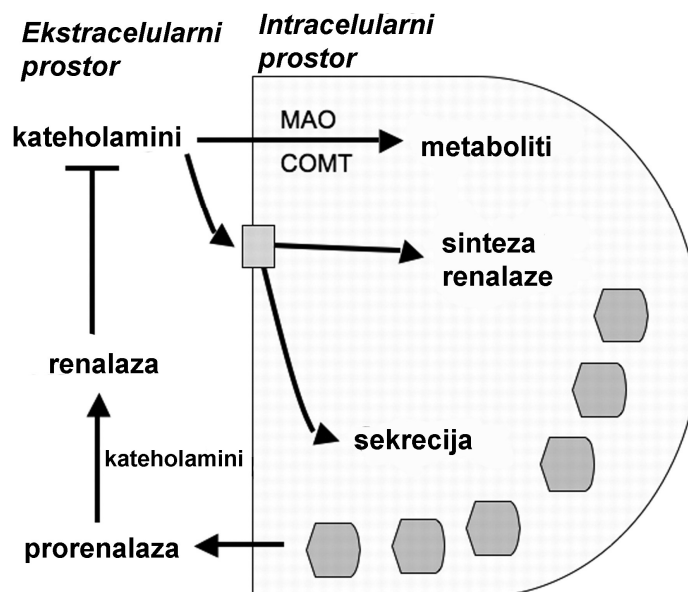
2.3.2. Renalaza-regulacija sekrecije i patofiziološki efekti

In vitro studije su pokazale da *hrenalaza1* metaboliše kateholamine i kateholaminima slične supstance putem superoksidazno-zavisnog mehanizma, koristeći NADP kao kofaktor, dok na ostale biogene amine, (serotonin, tiramin, spermidin, benzilamin i metilamin) nema nikakav fiziološki učinak.¹⁸⁰ Ovaj mehanizam se razlikuje od metabolizma MAO-A i MAO-B, jer renalaza zapravo vrši oksidaciju kateholamina (adrenalin>>L-DOPA>dopamin=noradrenalin) do aminohroma, pri čemu se sam proces

ubrzava 4 do 6 puta u prisustvu NADH.¹⁸⁴ Administracija *in vivo* hrenalaze 1 dovodi do smanjenja plazmatskih koncentracija adrenalina, L'DOPE i dopamina za 82%, 63% i 31%, pri čemu ne dolazi do značajnog porasta urinarne ekskrecije dezaminisanih ili metilisanih metabolita, sugerirajući da se efekat renalaze na kateholamine značajno razlikuje od drugih monoaminooksidaza.¹⁸⁴

U bazalnim uslovima renalaza cirkuliše u plazmi u neaktivnom obliku, sa poluživotom od 30-60 sekundi u formi proenzima, prorenalaze, čekajući adekvatan signal za aktivaciju, kao što je porast koncentracije kateholamina.¹⁸⁵ Ukoliko se *in vivo* daju infuzije kateholamina, dolazi do višestrukog uvećanja plazmatskih nivoa renalaze. Ovo se dešava u periodu od oko 30 sekundi, maksimalno 5 minuta, a brzina reakcije ukazuje da se najverovatnije radi o aktivaciji postojećeg proenzima u plazmi, a ne *de novo* sekreciji¹⁸⁵ (slika 5). Neaktivna forma nema značajnu amino oksidaznu aktivnost, a infuzija adrenalina u trajanju od 2 minuta dovodi do višestrukog porasta aktivnosti, od 48 ± 18 na 2246 ± 98 detektabilnih jedinica. Porast sistolnog pritiska za oko 7 mm/Hg dovoljan je za ovu vrstu aktivacije, sugerirajući da renalaza učestvuje u modulaciji krvnog pritiska,¹⁸⁴ pri čemu molekularni mehanizmi kojima renalaza inaktivira kateholamine nisu u potpunosti poznati. Elimira se urinom i smatra se da urinarna renalaza poseduje veći stepen aktivnosti od one u plazmi,¹⁸⁵ čak je pretpostavljeno da se ne radi o identičnim molekulima i da je urinarni nalaz daleko validniji. Kultura ćelija tretiranih dopaminom je pokazala povećanje ekspresije gena za renalazu oko 10 puta više u odnosu na normalu. Zato se smatra da kateholamini na najmanje tri različita načina regulišu sekreciju renalaze: a) stimulišu enzimsku aktivnost u krvi unutar prvog minuta; b) stimulišu sekreciju preformirane prorenalaze unutar 15 minuta; c) aktiviraju transkripciju gena unutar 12 sati.¹⁸⁴ Aktivacija prorenalaze je međutim smanjena kod pacova sa hroničnom bubrežnom bolešću. Na modelu nokaut miševa (renalaza-deficitarnog) dokazano je da smanjena ekspresija gena za renalazu ne menja značajno bubrežnu funkciju, ali dovodi do: 25% redukcije telesne težine, tahikardije, dijastolne hipertenzije i trostruko viših plazmatskih i urinarnih koncentracija kateholamina.¹⁸⁴ Takođe dovodi i do hipofosfatemije i povećane osetljivosti bubrega i miokarda na ishemiju.¹⁸⁶ Brzina razvoja miokardne ishemije i stepen nekroze oko tri puta su veći kod nokaut miševa, a studije su pokazale da naknadna administracija rekombinantne renalaze dovodi do smanjenog

nagomilavanja intersticijalne tečnosti u miokardu tokom ishemije, tako da značajno popravlja ishemiju.¹⁸⁶ Akutna bubrežna ishemija menja ekspresiju gena za renalazu u zavisnosti od težine i dužine trajanje ishemije.¹⁸⁴ Intravenozna administracija renalaze dovodi do dozno-zavisnog pada krvnog pritiska, pada srčane kontraktilnosti i frekvence, a inhibicija delovanja renalaze u eksperimentalnom modelu dovodi do porasta krvnog pritiska, ali i do patološkog skoka tenzije u stanjima akutnog stresa.



Slika 5. Predloženi mehanizam delovanja renalaze, preuzeto iz Li G.¹⁸⁴

2.3.3. Renalaza i dopaminergički sistem bubrega

Intrarenalni dopamin deluje natriuretski i fosfaturetski; ključni je regulator sekrecije natrijuma i fosfata; smatra se da reguliše sekreciju oko 50% natrijuma. Ima suprotan efekat angiotenzinu II. Povećana količina fosfata u ishrani dovodi do povećane sinteze dopamina, koji inhibiše reapsorpciju fosfata na nivou proksimalnih tubula. Proksimalni tubuli eksprimiraju dopaminergičke receptore na obe svoje membrane (apikalnoj i bazolateralnoj) i sintetišu dopamin od L-DOPE, nezavisno od nervne aktivnosti, koji čini više od polovine urinarnog dopamina. Deficit renalaze dovodi do umerene hipofosfatemije, verovatno usled povećane urinarne ekskrecije fosfata, uzrokovanih povišenom koncentracijom dopamina.¹⁸⁷

2.3.4. Uloga renalaze u patogenezi oštećenja bubrega i razvoju kardiovaskularnih bolesti

Uloga renalaze u regulaciji krvnog pritiska, eliminaciji natrijuma i fosfata i njena kardioprotektivna uloga još uvek nije u potpunosti pojašnjena, mada je uloga u metabolizmu kateholamina dokazana u nekoliko studija.^{184,185,188} Zna se da je hronična bubrežna bolest (HBI) u vezi sa brojnim sistemskim abnormalnostima: značajnom aktivacijom simpatičkog nervnog sistema i povišenim vrednostima kateholamina, hipertrofijom srca i hipertenzijom. Pacijenti sa HBI, naročito u terminalnim fazama, animalni modeli bubrežne bolesti (subtotalna nefrektomija) i so-senzitivne hipertenzije, imaju značajno redukovani nivo renalaze u plazmi, kao i neadekvatan odgovor prorenalaze na infuziju kateholamina. Simpatička aktivnost vrši modulaciju renalne hemodinamike putem α 1-adrenergičkih receptora, a direktno delujući na α 2 i α 1-receptore na peritubularnim membranama, dovodi do retencije soli i stimuliše oslobađanje renina iz jukstaglomerularnih ćelija preko β 1-adrenergičkih mehanizama. Bubrežna stvaralačka aferentna signala stimulacijom hemo i baroreceptora, pri čemu su ovi signali znatno snažniji i duže traju ukoliko je bubrežna oštećena. Dopamin i noradrenalin u plazmi su stalno povišeni i na taj način doprinose patogenezi kardiovaskularnog oštećenja. Visoke koncentracije kateholamina, naročito noradrenalina, mogu da deluju na srčane adrenergičke receptore (α 1), sa posledičnim povećanjem srčane mase i razvojem srčane insuficijencije. Iz navedenog se može zaključiti da je osnovni patogenetski mehanizam u razvoju hipertrofije leve komore/srčane insuficijencije zapravo adrenergička hiperstimulacija

Značajan morbiditet i mortalitet od kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa HBI može biti upravo posledica deficita renalaze i dominacije simpatičke aktivnosti. U bubrežnoj insuficijenciji gotovo uobičajen nalaz je hipertrofija leve komore, koja predstavlja nezavisni faktor rizika za kardiovaskularni mortalitet.

Vrednosti renalaze u plazmi kod uremičnih pacijenta su praktično nedektabilne, ali i kod zdravih dobrovoljaca, kada su vrednosti kateholamina niske, aktivnost renalaze u plazmi je takođe nedektabilna.^{184,185} Ovakva veza između renalaze i bubrežne funkcije sugeriše renalazu kao potencijalno dobar marker kardiovaskularnog oštećenja kod bubrežnih pacijenata. Njena identifikacija bi mogla da utiče na dijagnostičke i terapijske

mere za prevenciju ili tretman hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti: asimptomatske insuficijencije leve komore, kongestivne srčane insuficijencije, srčanih aritmija, ateroskleroze i infarkta miokarda, s obzirom da su ova stanja nesumnjivo u vezi sa pojačanom simpatičkom aktivnošću kod pacijenta sa HBI, ali i u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom. U skladu sa tim opisano je i nekoliko tipova genskih polimorfizama za renalazu kod pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom, dijabetes melitusom, moždanim udarom i koronarnom bolesti.

Renalaza ima značajan hipotenzivan efekat i mogla bi da predstavlja dobar antihipertenzivni tretman, naročito ukoliko je pritisak bubrežne etiologije. Renalaza ima protektivan efekat na ishemijsko i toksično oštećenje bubrega i miokarda,¹⁸⁹ administrirana pre povrede tkiva smanjuje apoptozu i inflamaciju na nivou bubrega i snažno korelira sa vrednostima kreatinina, a zabeleženo je i da njene vrednosti naglo povećavaju tokom oštećenja bubrega (pre kreatinina), te bi se mogla smatrati ranim markerom akutnog oštećenja bubrega (AKI).¹⁹⁰

Identifikacija i razumevanje biološkog efekta renalaze bi mogli da ukažu na stepen simpatičke aktivacije, koja leži u osnovi kardioneфроloških oštećenja i moguće objašnjenje visoke incidence mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti kod pacijenta sa HBI, kao i kod pacijenata nakon transplantacije bubrega.

3.0. Ciljevi istraživanja

- Proceniti postojanje elemenata endotelne disfunkcije (parametara hronične inflamacije i nitrozativnog stresa) kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, u periodu od najmanje 12 meseci nakon transplantacije.
- Kao parametre inflamacije, u ovoj grupi pacijenata, odrediti koncentracije adhezionih molekula u plazmi (ICAM-1 i VCAM-1) i vrednosti C-reaktivnog proteina.
- Od parametara nitrozativnog stresa odrediti plazmatske koncentracije nitrata, nitrita, endotelne azot monoksid sintaze i metilarginina, ADMA i SDMA.
- Kao parametar simpatičke aktivacije odrediti plazmatske koncentracije renalaze i uporediti ih sa vrednostima kod zdravih.
- Ustanoviti korelaciju između ovog enzima i stepena dislipidemije, parametara inflamacije, bubrežne funkcije i parametara nitrozativnog stresa.
- Utvrditi medjuzavisnost svih ispitivanih parametara endotelne disfunkcije.
- Ustanoviti šta se od ispitivanih parametara izdvaja kao nezavisni prediktor za smanjenje bubrežne funkcije kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.
- Odrediti i prediktore u multivarijantnom modelu, nakon prilagođavanja za godine, pušenje, gojaznost i prisustvo komorbiditeta (hipertenzije i šećerne bolesti).
- Uporediti prediktivne vrednosti svih ispitivanih parametara za smanjenje jačine glomerulske filtracije.
- Ispitati uticaj trostruke imunosupresivne terapije na sve parametre endotelne disfunkcije i utvrditi prednosti i nedostatke ovog tretmana kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.

4.0. Ispitanici i metode istraživanja

4.1. Ispitanici

Istraživanje je sprovedeno na Klinici za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju Kliničkog centra u Nišu i Medicinskom fakultetu u Nišu, u periodu od marta do decembra 2012. godine. Obuhvaćeno je 73 ispitanika starijih od 18 godina, oba pola, koji su bili detaljno upućeni u svrhu istraživanja. Svako od ispitanika je pojedinačno potpisao informativni pristanak. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu i sprovedeno je u skladu sa Helsinškom deklaracijom i pravilima dobre kliničke prakse. Kontrolnu grupu činila su 32 zdrava ispitanika, 20 muškaraca i 12 žena, koji su bili sličnih polnih i starosnih karakteristika kao i grupa ispitanika. Rekrutovani su iz redova medicinskog osoblja klinike na kojoj je vršeno ispitivanje, a kod kojih je na osnovu kliničko-anamnestičkih, laboratorijskih i funkcionalnih ispitivanja isključeno postojanje bilo kakvog patološkog procesa.

Osnovni kriterijumi za uključenje u studiju pacijenata sa transplantiranim bubregom su bili:

- posttransplantacioni period od najmanje 12 meseci
- odsustvo klinički manifestne kardiovaskularne bolesti i znakova odbacivanja grafta
- standardni imunosupresivni terapijski protokol (tri vrste imunosupresiva)

Svi anamnestički podaci, klinički pregled, potpisivanje pristanka i vađenje krvi bili su obavljani tokom njihovih rutinskih kontrola. Standardni imunosupresivni protokol prema KDIGO smernicama iz 2009. godine činila je kombinacija tri grupe lekova: kalcineurinski inhibitori (ciklosporin A ili takrolimus), mikofenolat mofetil (MMF) i kortikosteroidi.¹⁹¹ Na osnovu imunosupresivne terapije ispitanici su bili podeljeni u dve podgrupe. Prvu podgrupu su činili pacijenti koji su bili na terapiji ciklosporinom A (3 mg/kgTT/d) u kombinaciji sa MMF (1,5-2g/kgTT/d) i prednizonom (5-20mg/d), dok je druga podgrupa pacijanata grupa bila na terapiji takrolimusom (0,05-0,1mg/kgTT/d),

MMF i prednizonom. Arterijski pritisak je meren digitalnim aparatom, po dva puta, u sedećem položaju, sa pravljenjem pauze od jednog minuta, a zatim je izračunavana srednja vrednost sistolnog i dijastolnog pritiska. Hipertenzijom su smatrane sve vrednosti više od 130/80 mmHg prema KDIGO smernicama.¹⁹² Antihipertenzivna terapija obuhvatala je četiri grupe antihipertenziva: blokatori kalcijumovih kanala, β blokatori, ACE inhibitori i diuretici. Na osnovu propisane antihipertenzivne terapije pacijenti su bili podeljeni u dve podgrupe. Prvu podgrupu činili su pacijenti koji su koristili ACE inhibitore u kombinaciji sa ostalim antihipertenzivima i drugu podgrupu pacijenti koji su kao antihipertenzivnu terapiju koristili isključivo diuretike, β -blokatore ili antagonist kalcijumovih kanala. Svim pacijentima računat je indeks telesne mase (ITM): [težina (kg)/(visina (m)²)].

Bubrežna funkcija procenjavana je na osnovu serumskih vrednosti kreatinina i određivanja klirensa kreatinina, korišćenjem Cockcroft–Gault jednačine: $Cl_{Cr} = (140 - \text{godine} - (\text{kg})) \times 1,23 \times 0,85 / \text{Pcr}$.¹⁹³ Povišenim vrednostima kreatinina smatrane su sve vrednosti više od 115 $\mu\text{mol/l}$. Bubrežnom disfunkcijom označavane su sve vrednosti jačine glomerulske filtracije manje od 60 ml/min/1,73m².

Svi lipidi, lipoproteini i lipoproteinski odnosi računati su i grupisani u kategorije prema Nacionalnom vodiču za tretman i lečenje dislipidemija, 2011,¹⁹⁴ što je prikazano u tabeli u 4. Non-HDL je računat kao razlika totalnog holesterola i HDL-a. LDL-holesterol je dobijen računanjem prema Friedewald-oj jednačini.¹⁹⁵

Tabela 4. Lipidni status kod odraslih osoba sa poželjnim i rizičnim vrednostima parametar koncentracija*

Parametar (mmol/l)	Poželjno	Granično povišen rizik	Visoko rizično
Ukupni holesterol:	do 5,20	5,20–6,19	$\geq 6,20$
Trigliceridi:	do 1,70	1,70–2,29	$\geq 2,30$
HDL-holesterol:	$\geq 1,60$	1,00–1,60	$\leq 1,00$
LDL-holesterol:	do 3,40	3,40–4,10	$\geq 4,10$
Non-HDL-holesterol:	do 3,40	3,40–4,10	$\geq 4,90$
Odnosi:			
Indeks ateroskleroze (LDL/HDL-holesterol):	do 3,00	3,00–3,50	$> 3,50$
Ukupni/HDL-holesterol:	do 4,50	4,50–5,00	$> 5,00$
Non-HDL/HDL-holesterol:	do 3,25	–	–

* preuzeto iz Nacionalnog vodiča dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja, 2011.

4.2. Metode

4.2.1. Hematološko-biohemijske analize

Sve analize sprovedene su u biohemijskoj laboratoriji Klinike za nefrologiju (Erba XL600, Germany) i Centru za medicinsku biohemiju KC Niš. Svakom ispitaniku je venepunkcijom uzimano 10 ml krvi, korišćenjem standardnih vakutajnera i iz uzoraka krvi određivani su kompletna krvna slika, ureja, kreatinin, holesterol, trigliceridi, lipoproteini (HDL i LDL) i CRP. C-reaktivni protein je određivan imunoturbidimetrijskim testom, gde CRP reaguje specifično sa antihumanim CRP-antitelima, obeleženim lateks partikulama pri čemu nastaju nerastvoreni precipitati. Nastala apsorbancija ovih precipitata proporcionalna je koncentraciji CRP u uzorku. Koncentracija CRP je određivana na Olympusu AU400 (Beckman Coulter) i izražena je u mg/l. Referentne vrednosti su u granicama 0-5 mg/l. Pored ovih parametara određivana je plazmatska koncentracija adhezionih molekula, renalaze i parametara nitroizotivnog stresa, pri čemu je plazma pre toga zamrzavana na -70°C .

4.2.2. Određivanje koncentracija adhezionih molekula, renalaze i eNOS

Adhezioni molekuli (ICAM-1 i VCAM-1), kao i eNOS su mereni u plazmi upotrebom komercijalnih ELISA kitova R&D Systems, Quantikine, Abingdon, United Kingdom. Minimalna detektabilna doza za ICAM-1 bila je 0,096 ng/ml (0,049-0,254 ng/ml). Referentne vrednosti za kontrolu iznosile su $211 \pm 42,9$ ng/ml (100-307). Minimalna detektabilna doza za VCAM-1 bila je 0,6 ng/mL, (0,17-1,26 ng/ml). Referentne vrednosti za kontrolu bile su $531 \pm 132,5$ ng/ml (341-897).

Minimalna detektabilna doza za eNOS iznosila je 25 ng/ml.

Renalaza je merena u plazmi upotrebom komercijalnog ELISA kita, Uscn Life Science Inc, China. Minimalna detektabilna doza za renalazu bila je 1,45 ng/ml, sa detekcijom između 3,12-200 ng/ml.

4.2.3. Određivanje koncentracija dimetilarginina

Dimetilarginini, ADMA i SDMA, su određivani metodom tečne hromatografije, metodom po Paroniju,¹⁹⁶ uz izvesne modifikacije. Interni standard (monometilarginin 50 µL, 10µM) je dodavan uzorku plazme (0,2ml) i podvrgnut „solid phase“ ekstrakciji koristeći katjonsko-izmenjivačke kolone (SPE cartridge, Supelco Discovery DSC-MCAX, 100 mg/ml). Kolone su prvo aktivirane metanolom (1 ml) i 2% trihlorsirćetnom kiselinom (TCA 2 ml). Nakon ispiranja (TCA 2% 150 mmol/L fosfatni pufer pH 8,0, metanol), aminokiseline su eluirane sa 1,2 ml 2% rastvora trietilamina (TEA) u metanolu i vodi (70:30, v:v). Eluat je uparavan do suvog gasnim azotom, a suvi ostatak je zatim rastvoren u 0,4 ml pufera (mobilna faza A) i na kraju je vršena derivatizacija ortoftaldialdehidom (OPA), pre nego što je 20µl injektovano u tečni hromatograf. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC; High Performance Liquid Chromatography) je vršena na instrumentu „Agilent 1200 Series“ koji je opremljen autosemplerom, binarnom pumpom i fluorescentnim detektorom. Hromatografsko odvajanje je postignuto uz upotrebu kolone Zorbax SB-C18 (150x4,6 mm, 3,5 µm) i odgovarajućeg gradijenta dve mobilne faze: A-(fosfatni pufer, 40 mmol/l, pH 6,2) i B-(acetonitril:metanol (50:50, v:v). Odvajanje metilarginina je postignuto gradijentom dve mobilne faze A i B, pri protoku od 1,5 mL/min. Analiza je počela pri gradijentu od 15% faze B, u narednih 10 minuta gradijent je porastao na 25% mobilne faze B. Zatim je rastao linearno do 80% tokom 3 minuta održavajući taj nivo naredna 3 minuta, nakon čega je vraćena na početni nivo, što ujedno predstavlja i kraj separacije. Analize su obavljene na Institutu za biomedicinska istraživanja na Medicinskom fakultetu u Nišu.

4.2.4. Određivanje koncentracija nitrita i nitrata

Produkcija azot monoksida (NO) je nakon deproteinizacije određivana merenjem koncentracije nitrita i nitrata (NOx). Nitriti su određivani direktno spektrofotometrijski na 543 nm, kolorimetrijskom metodom po Navaro-Gonzalesu.¹⁹⁷ Grizov reagens činio je 1,5% sulfanilamid u 1 M HCl sa 0,15% N-(1-naphthyl) etilendiamin dihidrohloridom u destilisanjoj vodi. Nitrati su prvo transformisani u nitrite redukcijom pomoću kadmijuma.

Sve hemikalije bile su Sigma (St LUIS, USA), a reagensi su pripremljeni na dan izvođenja eksperimenta.

4.3. Statističke analize

Dobijeni podaci raspoređeni po tipu normalnosti su izraženi srednjim vrednostima kao reprezentativnim merama centralne tendencije i standardnim devijacijama kao merama varijabiliteta. Poređenje parametrijskih obeležja sa normalnim rasporedom vršeno je Studentovim t-testom. Parametrijske vrednosti koje odstupaju od normalnog rasporeda predstavljene su medijanama kao reprezentativnim merama centralne tendencije i interkvartilnim razlikama kao merama varijabilnosti. Poređenje ovih vrednosti je vršeno neparametrijskim Mann Whitney U testom. Poređenje srednjih vrednosti renalaze u odnosu na tip antihipertenzivne terapije vršeno je analizom varijanse (ANOVA), a utvrđivanje međugrupnih razlika podgovarajućim post hoc testovima. Za određivanje međuzavisnosti između renalaze, jačine glomerulske filtracije i parametara endotelne disfunkcije kod pacijenata sa transplantatom korišćena je Pirsonova linearna korelacija i dobijene značajne korelacije predstavljene su grafički tačkastim korelacionim grafikom.

Za definisanje prediktivnih vrednosti jačine glomerulske filtracije manje od $60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ korišćena je univarijantna logistička regresija i parametri sa nivoom značajnosti $p < 0,05$ koji su uvedeni u multivarijantni model, a nakon toga je vršeno prilagođavanje za godine, pušenje, gojaznost i prisustvo komorbiditeta (hipertenzija i šećerna bolest). Rezultati logističke regresije su predstavljeni unakrsnim odnosom (OR), 95% intervalom poverenja i p vrednostima.

Statističke analize su urađene pomoću softverskog paketa SPSS (verzija 18) na nivou značajnosti $p < 0,05$.

5.0. Rezultati

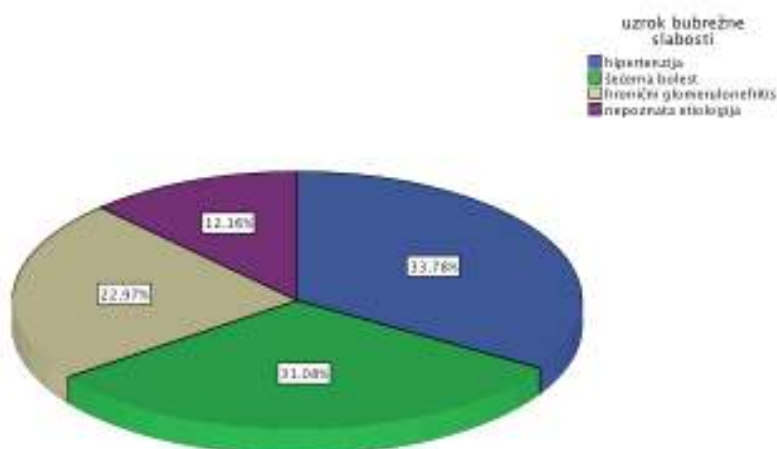
5.1. Demografske karakteristike ispitanika

Istraživanje je obuhvatilo 105 ispitanika, od čega je 73 činilo kliničku grupu (pacijenti sa transplantiranim bubregom) i 32 zdrava ispitanika, koji su bili u kontrolnoj grupu. Prosečna starosna struktura kliničke grupe iznosila je $43,92 \pm 11,21$ godine, a u kontrolnoj grupi $41,20 \pm 10,74$ godine. Struktura ispitanika sa transplantiranim bubregom pokazala je da je 50 (68,5%) pacijenata bilo muškog, a 23 (31,5%) ženskog pola. U kontrolnoj grupi 20 (62,5%) ispitanika je bilo muškog, a 12 (37,5%) ispitanica je bilo ženskog pola. Kod 54 (74%) pacijenata transplantacija je izvršena sa živog donora, a kod kod ostalih 19 (26%) pacijenata, radilo se o kadaveričnoj transplantaciji. Prosečan posttransplantacioni period iznosio je 4 godine (minimalno 12 meseci, maksimalno 24 godine), a dužina dijaliznog perioda iznosila je, u proseku, 19 meseci. Od ukupnog broja pacijenata sa transplantatom, kod 16 (22%) pacijenata terapijski protokol uključivao je ciklosporin/MMF/pronizon, a 57 pacijenata (78%) bilo je na terapiji takrolimus/MMF/pronizon. Na antihipertenzivnoj terapiji bilo je 63 (86%) pacijenata i to ACE inhibitore, kao prvi lek, koristilo je 23 (31,5%) pacijenata, a njih 40 (54,79%) koristilo je kalcijum antagoniste, β -blokatorie i diuretike. Najveći broj pacijenata, kao deo svog terapijskog protokola, koristio je β -blokatore, njih 40 (63,63%). Svi opisani podaci prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5. Osnovne demografske i kliničke karakteristike 73 pacijenata sa transplantatom uključenih u istraživanje

Pol	n(%), $\bar{X} \pm SD$, Med (IQR)
muškarci	50 (68,49)
žene	23 (31,51)
Starost (godine)	43,92 \pm 11,21 (20-69)
Etiologija bubrežne bolesti	
hipertenzivna bolest	25 (33,78)
dijabetes melitus (tip 1+2)	23 (31,08)
hronični glomerulonefritis	17 (22,97)
drugi/nepoznati	8 (12,16)
Dužina dijaliznog perioda, meseci	19 (32)
Vrsta transplantacije	
porekla preminulog donora	19 (26,02)
porekla živog donora	54 (73,97)
Posttransplantacioni period, godine	4,0 (5)
Imunosupresivna terapija	
ciklosporin/MMF/pronizon	16 (21,91)
takrolimus/MMF/pronizon	57 (78,08)
Antihipertenzivna terapija	
ACE inhibitori	23 (31,5)
bez ACE inhibitora	40 (54,79)

Kod 25 pacijenata (33,78%) glavni uzrok nastanka bubrežne slabosti bila je hipertenzivna bolest, dijabetesna nefropatija kod 23 (31,08%) pacijenata, hronični glomerulonefritis kod 17 (22,97%) pacijenata, dok kod 8 (12,16%) pacijenata nije utvrđen razlog nastanka bubrežne slabosti. Podaci su prikazani na grafikonu broj 1.

**Grafikon 1.** Etiologija hronične bubrežne slabosti

U tabeli 6 prikazani su faktori rizika prisutni kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Od ukupnog broja pacijenata, njih 63 (86%) imalo je hipertenziju, 24 (32,88%) ispitanika bili su pušači, vrednosti kreatinina više od $115\mu\text{mol/l}$ zabeležene su kod 53 (72,6%) ispitanika, glomerulska filtracija manja od $60\text{ml/min}/1,73\text{m}^2$ kod 37 (50,7%) ispitanika, ukupni holesterol viši od $5,2\text{ mmol/l}$ kod 61 (83,6%), HDL niži od $1,6\text{mmol/l}$ kod 51 (69,9%), LDL viši od $3,4\text{ mmol/l}$ kod 46 (63%), non-HDL viši od $3,4\text{ mmol/l}$ kod 64 (87,7%) i vrednosti triglicerida više od $1,7\text{mmol/l}$ imalo je 49 (67,1%) ispitanika.

Tabela 6. Distribucija faktora rizika kod 73 pacijenata sa transplantatom

Faktori rizika	n(%)
Pušenje	
da	24 (32,88)
ne	49 (67,12)
Hipertenzija	
da	63 (86,3)
ne	10 (13,7)
Kreatinin $>115\mu\text{mol/l}$	53 (72,6)
JGF $<60\text{ml/min}/1,73\text{m}^2$	37 (50,69)
Holesterol ($>5,2\text{ mmol/l}$)	61 (83,56)
HDL ($<1,0\text{ mmol/l}$)	51 (69,86)
LDL ($>3,4\text{ mmol/l}$)	46 (63,01)
non-HDL ($>3,4\text{ mmol/l}$)	64 (87,67)
Tg ($>1,7\text{ mmol/l}$)	49 (67,12)

5.2. Poređenje demografskih i kliničkih parametara kliničke i kontrolne grupe

U tabeli 7 prikazane su demografske i kliničke karakteristike ispitanika kontrolne i kliničke grupe.

Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u starosti između ispitivanih grupa ($t=1,079$, $p=0,286$), kao ni razlike između muškaraca i žena ($t=0,076$, $p=0,423$; $t=0,331$, $p=0,214$).

Poređenjem kliničkih parametara uočene su statistički značajno više vrednosti sistolnog krvnog pritiska kod ispitanika sa transplantatom ($129,32 \pm 11,16$ vs $109,40 \pm 12,61$; $t=7,012$, $p<0,001$), kao i više vrednosti dijastolnog pritiska u istoj grupi ispitanika ($81,58 \pm 7,9$ vs $71,80 \pm 10,88$; $t=4,133$, $p<0,001$). Postojale su i statistički značajno niže vrednosti hemoglobina kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na kontrolnu grupu ($13,51 \pm 2,19$ vs $14,72 \pm 1,45$; $t=3,109$, $p=0,003$), dok je broj leukocita bio statistički viši kod ispitanika sa transplantatom ($8,55 \pm 2,22$ vs $7,08 \pm 1,68$; $t=3,019$, $p=0,003$). Vrednosti ureje i kreatinina takođe su bile značajno povećani kod pacijenata sa transplantatom ($10,41 \pm 6,47$ vs $4,73 \pm 0,89$; $t=7,293$, $p<0,001$ i $155,60 \pm 69,02$ vs $95,16 \pm 10,6$; $t=7,187$, $p<0,001$), a vrednosti klirensa kreatinina bile su statistički značajno niže kod pacijenata u kliničkoj grupi ($63,15 \pm 23,61$ vs $92,32 \pm 17,92$; $t=6,428$, $p<0,001$).

Nije nađena statistička značajnost u vrednostima indeksa telesne mase ($t=1,178$, $p=0,242$), broja eritrocita ($t=1,441$, $p=0,153$), kao i vrednosti C-reaktivnog proteina ($Z=1,859$, $p=0,066$).

Tabela 7. Klinički i biohemijski parametri pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu

	Pacijenti sa transplantatom	Kontrolna grupa	t/Z ¹	p
Starost (godine)	43,92±11,21	41,20±10,74	1,079	0,286
ITM (kg/m ²)	25,92±4,29	24,77±3,96	1,178	0,242
Sistolni krvni pritisak (mm/Hg)	129,32±11,16	109,40±12,61	7,012	<0,001
Dijastolni krvni pritisak (mm/Hg)	81,58±7,9	71,80±10,88	4,133	<0,001
Eritrociti x 10 ¹² /l	4,73±0,76	4,90±0,38	1,441	0,153
Hemoglobin (g/dl)	13,51±2,19	14,72±1,45	3,109	0,003
Leukociti x 10 ⁹ /l	8,55±2,22	7,08±1,68	3,019	0,003
C-reaktivni protein (mg/l)	1,90 (5,20)	2,53(2,71)	1,859 ¹	0,066
Ureja (mmol/l)	10,41±6,47	4,73±0,89	7,293	<0,001
Kreatinin (μmol/l)	155,60±69,02	95,16±10,6	7,187	<0,001
Klirens kreatinina ml/min/1,73m ² (Cockcroft-Gault)	63,15±23,61	92,32±17,92	6,428	<0,001

Poređenjem vrednosti parametara lipidnog statusa između ispitanika kliničke i kontrolne grupe uočene su statistički značajne razlike i to; vrednosti ukupnog holesterola ($6,55 \pm 1,51$ vs $5,37 \pm 1,14$; $t=3,579$, $p<0,001$), LDL-holesterola ($3,74 \pm 1,01$ vs $3,12 \pm 0,63$; $t=2,762$, $p=0,009$), nonHDL-holesterola ($5,29 \pm 1,51$ vs $4,01 \pm 1,11$; $t=3,917$, $p<0,001$),

triglicerida ($3,13 \pm 2,7$ vs $1,40 \pm 0,76$; $t=4,853$, $p<0,001$), odnosi: non-HDL/HDL ($4,41 \pm 2,32$ vs $3,20 \pm 0,951$; $Z=-2,170$, $p=0,03$), ukupni holesterol/HDL ($5,39 \pm 2,3$ vs $4,20 \pm 0,951$; $t=2,030$, $p=0,046$), kao i odnos Tg/HDL ($2,87 \pm 3,66$ vs $1,41 \pm 1,07$; $Z=-2,721$, $p=0,007$). Svi rezultati prikazani su u tabeli 8.

Međutim, vrednosti HDL-holesterola, kao i odnos LDL/HDL-holesterola nisu pokazali statistički značajnu razliku kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na kontrolnu grupu ($t=0,384$, $p=0,702$, $t=0,942$, $p=0,349$).

Tabela 8. Lipidni status kod pacijenata sa transplantatom u poređenju sa kontrolnom grupom

Lipidni parametar	Pacijenti sa transplantatom (Tx)	Kontrolna grupa	t/Z ¹	p
Ukupni holesterol (mmol/l)	$6,55 \pm 1,51$	$5,37 \pm 1,14$	3,579	<0,001
LDL (mmol/l)	$3,74 \pm 1,01$	$3,12 \pm 0,63$	2,762	0,009
HDL (mmol/l)	$1,33 \pm 0,35$	$1,36 \pm 0,29$	0,384	0,702
non-HDL (mmol/l)	$5,29 \pm 1,51$	$4,01 \pm 1,11$	3,917	<0,001
Tg (mmol/l)	$3,13 \pm 2,7$	$1,40 \pm 0,76$	4,853	<0,001
(non-HDL)/HDL (mmol/l)	$4,41 \pm 2,32$	$3,20 \pm 0,951$	-2,170 ¹	0,030
Holesterol/HDL (mmol/l)	$5,39 \pm 2,3$	$4,20 \pm 0,951$	2,030	0,046
LDL/HDL (mmol/l)	$2,99 \pm 1,3$	$2,68 \pm 0,75$	0,942	0,349
Tg/HDL (mmol/l)	$2,87 \pm 3,66$	$1,41 \pm 1,07$	-2,721 ¹	0,007

Poređenjem parametara nitrozativnog stresa, hronične inflamacije i renalaze, prikazanih u tabeli 9, uočena je statistički značajna razlika svih posmatranih parametara. Značajno više vrednosti bile su kod ispitanika sa transplantatom i to na nivou značajnosti $p<0,001$. Prosečne vrednosti nitrata ($111,06 \pm 32,18$ vs $82,36 \pm 19,75$; $t=4,716$, $p<0,001$), eNOS-a ($309,57 \pm 49,91$ vs $207,05 \pm 42,51$; $t=9,068$, $p<0,001$), ADMA ($0,53 \pm 0,11$ vs $0,45 \pm 0,10$; $t=3,546$, $p=0,001$), SDMA ($0,82 \pm 0,32$ vs $0,54 \pm 0,08$; $t=6,834$, $p<0,001$), renalaze ($141,82 \pm 36,47$ vs $16,36 \pm 4,13$; $t=27,377$, $p<0,001$), ICAM-1 ($233,78 \pm 49,21$ vs $120,15 \pm 43,99$; $t=8,514$, $p<0,001$) i vrednosti VCAM-1 ($684,02 \pm 49,5$ vs $524,24 \pm 78,8$; $t=10,332$, $p<0,001$) bili su značajno viši u odnosu na kontrolu.

Tabela 9. Razlike u ispitivanim parametrima endotelne disfunkcije i renalaze između pacijenata sa transplantatom i kontrolne grupe

Parametar	Pacijenti sa transplantatom	Kontrolna grupa	t	p
Nitrati (NO ₂ /NO ₃) (μmol/l)	111,06±32,18	82,36±19,75	4,716	<0,001
eNOS (pg/ml)	309,57±49,91	207,05±42,51	9,068	<0,001
ADMA (μmol/l)	0,53±0,11	0,45±0,10	3,546	0,001
SDMA(μmol/l)	0,82±0,32	0,54±0,08	6,834	<0,001
Renalaza (ng/ml)	141,82±36,47	16,36±4,13	27,377	<0,001
ICAM-1 (ng/ml)	233,78±49,21	120,15±43,99	8,514	<0,001
VCAM-1 (ng/ml)	684,02±49,5	524,24±78,8	10,332	<0,001

U univarijantnom logističkom modelu kao faktori rizika za smanjenje jačine glomerulske filtracije manje 60 ml/min/1,73m² izdvojile su se vrednosti ukupnog holesterola u rasponu od 5,2-6,19 mmol/l (OR=4,048; 95%CI=1,929-17,629; p<0,05), kao i vrednosti ukupnog holesterola više od 6,2 mmol/l (OR=8,000; 95%CI=2,021-31,662; p<0,01). Značajne faktore rizika su predstavljale i vrednosti LDL-a≥4,1 mmol/l u odnosu na vrednosti LDL-a<3,4 (OR=1,857; 95%CI=1,667-5,175; p<0,05) i vrednosti non-HDL-a više od 4,2 mmol/l u odnosu na vrednosti niže od 3,4 mmol/l (OR=7,233; 95%CI=1,839-62,382; p<0,05), (tabela 10).

Nakon prilagođavanja za godine nije došlo do promene posmatranih faktora rizika. I dalje su se kao faktori rizika za smanjenje jačine glomerulske filtracije izdvajale vrednosti ukupnog holesterola 5,2-6,19 mmol/l (OR=4,679; 95%CI=1,004-22,010; p<0,05), kao i vrednosti holesterola više od 6,2 mmol/l (OR=7,481; 95%CI=1,797-31,146; p<0,01) u odnosu na vrednosti holesterola niže od 5,2 mmol/l, tabela 11. Pored tog značajni faktori rizika, nakon prilagođavanja za godine, bile su i vrednosti LDL-a≥4,1 mmol/l u odnosu na vrednosti LDL-a<3,4 mmol/l (OR=1,662; 95%CI=1,558-4,955; p<0,01) i vrednosti non-HDL-a više od 4,2 mmol/l u odnosu na vrednosti niže od 3,4mmol/l (OR=8,704; 95%CI=1,111-83,453; p<0,05), (tabela 11).

Tabela 10. Univarijantni ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) za smanjenje jačine glomerulske filtracije (JGF<60 ml/min/1,73m²) u odnosu na ukupni holesterol, HDL, LDL, Tg, non-HDL i lipidne odnose: LDL/HDL, ukupni holesterol/HDL, non-HDL/HDL

Lipidni parametar	univarijantni OR	95%CI	p
Ukupni holesterol (mmol/L)			
<5,2	[1]		
5,2-6,19	4,048	1,929-17,629	p<0,05
≥6,2	8,000	2,021-31,662	p<0,01
Tg (mmol/l)			
<1,7	[1]		
1,7-2,29	0,664	0,186-3,368	0,655
≥2,3	1,462	0,571-3,738	0,879
HDL (mmol/l)			
≥1,6	[1]		
1-1,6	0,349	0,108-1,132	0,880
≤1	0,424	0,104-1,724	0,435
LDL (mmol/l)			
<3.4	[1]		
3,4-4,0	0,779	0,224-2,708	0,098
≥4,1	1,857	1,667-5,175	p<0,05
non-HDL (mmol/l)			
<3.4	[1]		
3,4-4,1	3,500	0,346-35,371	0,067
>4,2	7,233	1,839-62,382	p<0,05
LDL/HDL (mmol/l)			
<3	[1]		
3-3,5	0,525	0,124-2,228	0,989
>3,6	1,260	0,433-3,665	1,978
Ukupni holesterol/HDL (mmol/l)			
<4,5	[1]		
4,5-5	0,667	0,162-2,635	0,970
>5,1	1,176	0,448-3,086	1,001
non-HDL/HDL (mmol/l)			
<3,25	[1]		
≥3,25	1,267	0,515-3,116	1,330

Tabela 11. Ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) nakon prilagođavanja za godine za smanjenje jačine glomerulske filtracije ($JGF < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) u odnosu na ukupni holesterol, HDL, LDL, Tg, non-HDL i lipidne odnose: LDL/HDL, ukupni holesterol/HDL, non-HDL/HDL

Lipidni parametar	OR prilagođen za godine	95%CI	p
Ukupni holesterol (mmol/L)			
<5,2	[1]		
5,2-6,19	4,679	1,004-22,010	p<0,05
≥6,2	7,481	1,797-31,146	p<0,01
Tg (mmol/l)			
<1,7	[1]		
1,7-2,29	0,908	0,231-3,580	0,453
≥2,3	1,770	0,640-4,890	0,546
HDL (mmol/l)			
≥1,6	[1]		
1-1,6	0,336	0,095-1,202	0,256
≤1	0,485	0,109-2,168	0,342
LDL (mmol/l)			
<3,4	[1]		
3,4-4,0	0,770	0,203-2,925	0,078
≥4,1	1,662	1,558-4,955	p<0,01
non-HDL (mmol/l)			
<3,4	[1]		
3,4-4,1	4,656	0,406-53,444	
>4,2	8,704	1,111-83,453	p<0,05
LDL/HDL (mmol/l)			
<3	[1]		
3-3,5	0,448	0,096-2,101	0,236
>3,6	1,250	0,404-3,869	0,397
Ukupni holesterol/HDL (mmol/l)			
<4,5	[1]		
4,5-5	1,092	0,250-4,777	0,137
>5,1	1,085	0,390-3,014	0,243
non-HDL/HDL (mmol/l)			
<3,25	[1]		
≥3,25	1,323	0,504-3,470	0,453

U multivarijantnom modelu, nakon prilagođavanja za godine starosti (kontinuirano), ITM (kontinuirano), prisustvo hipertenzije (da, ne), prisustvo šećerne bolesti (da, ne) i pušenje (da, ne), svi statistički značajni faktori u prethodna dva modela pokazali su značajnost i u ovom. Vrednosti ukupnog holesterola, više od 5,2-6,19 mmol/l, ponovo su se izdvojile kao značajan faktor rizika za smanjenje jačine glomerulske filtracije <math><60 \text{ ml/min/1,73m}^2</math> (OR=3,311; 95%CI=1,624-17,564; $p<0,05$), kao i vrednosti više od 6,2 mmol/l (OR=5,431; 95%CI=1,090-27,049; $p<0,05$) u odnosu na vrednosti holesterola manje od 5,2mmol/l.

Značajni faktori rizika u multivarijantnom modelu za smanjenje jačine glomerulske filtracije manje 60 ml/min/1,73m² su i vrednosti LDL-a ≥4,1 mmol/l u odnosu na vrednosti LDL-a <3,4 mmol/l (OR=1,484; 95%CI=1,434-5,079; $p<0,01$) i vrednosti non-HDL-a više od 4,2 mmol/l u odnosu na koncentracije niže od 3,4 mmol/l (OR=7,159; 95%CI=1,643-79,666; $p<0,05$). Svi rezultati prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Multivarijantni ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) za smanjene jačine glomerulske filtracije (JGF<60 ml/min/1,73m²) u odnosu na ukupni holesterol, HDL, LDL, TG, non-HDL i lipidne odnose: LDL/HDL, ukupni holesterol/HDL, non-HDL/HDL

Lipidni parametar	Multivarijantni OR	95%CI	p
Ukupni holesterol (mmol/l)			
<5,2	[1]		
5,2-6,19	3,311	1,624-17,564	p<0,05
≥6,2	5,431	1,090-27,049	p<0,05
Tg (mmol/l)			
<1,7	[1]		
1,7-2,29	0,784	0,186-3,311	1,978
≥2,3	1,630	0,485-5,480	1,311
HDL (mmol/l)			
≥1,6	[1]		
1-1,6	0,335	0,081-1,385	1,115
≤1	0,438	0,086-2,223	0,102
LDL (mmol/l)			
<3,4	[1]		
3,4-4,0	0,714	0,170-3,001	0,898
≥4,1	1,484	1,434-5,079	p<0,01
non-HDL (mmol/l)			
<3,4	[1]		
3,4-4,1	5,561	0,422-73,256	1,003
>4,2	7,159	1,643-79,666	p<0,05
LDL/HDL (mmol/l)			
<3	[1]		
3-3,5	0,569	0,107-3,026	0,312
>3,6	0,941	0,272-3,256	0,426
Ukupni holesterol/HDL(mmol/l)			
<4,5	[1]		
4,5-5	1,131	0,220-5,813	0,787
>5,1	0,646	0,187-2,227	0,811
non-HDL/HDL (mmol/l)			
<3,25	[1]		
≥3,25	1,001	0,338-2,965	0,234

Multivarijantni model- prilagođen za godine (kontinuirano), ITM (kontinuirano), prisustvo arterijske hipertenzije (da, ne), šećerna bolest (da, ne), pušenje (da, ne)

U univarijantnom modelu, koncentracije adhezionih molekula VCAM-1 u najvišem kvartilu u odnosu na najniži kvartil, predstavljale su faktor rizika za smanjenje jačine glomerulske filtracije ispod 60ml/min/1,73m² (OR=4,622; 95%CI=1,240-17,226; p=0,009). Faktor rizika u istom modelu predstavljale su i povećane vrednosti koncentracija renalaze (OR=5,455; 95%CI=1,226-24,261; p=0,026), dok su vrednosti koncentracije eNOS bile protektivni faktor za jačinu glomerulske filtracije (OR=0,113; 95%CI=0,021-0,605; p=0,011), (tabela 13). Ostali analizirani parametri; ICAM-1 (OR=2,354; 95%CI=0,635-8,725; p=0,425), nitrati (OR=3,00; 95%CI=0,786-11,445; p=0,108), ADMA (OR=2,031; 95%CI=0,516-8,003; p=0,311) i SDMA (OR=3,802; 95%CI=0,807-12,751; p=0,098) nisu imali uticaj na jačinu glomerulske filtracije, (tabela 13).

Tabela 13. Univarijantni (OR) i 95% interval poverenja (CI) za smanjenje smanjene jačine glomerulske filtracije (JGF<60 ml/min/1,73m²) u odnosu na koncentracije ICAM-1, VCAM-1, nitrata (NO₂/NO₃), eNOS, ADMA, SDMA i renalazu

Parametar	univarijantni OR	95% CI	p
ICAM-1 ¹ pg/ml	2,354	0,635-8,725	0,425
VCAM-1 ¹ pg/ml	4,622	1,240-17,226	0,009
Nitrati (μmol/l)	3,00	0,786-11,445	0,108
eNOS (pg/ml)	0,113	0,021-0,605	0,011
ADMA (μmol/l)	2,031	0,516-8,003	0,311
SDMA (μmol/l)	3,802	0,807-12,751	0,098
Renalaza (ng/ml)	5,455	1,226-24,261	0,026

¹-najviši vs najniži kvartil

Isti odnos faktora rizika bio je i nakon prilagođavanja za godine, gde je najviši kvartil koncentracija VCAM-1 predstavljao faktor rizika (OR=4,215; 95%CI=1,369-11,362; p<0,05), kao i više vrednosti renalaze (OR=6,089; 95%CI=1,063-34,860; p=0,042), dok su koncentracije eNOS-a i dalje bile protektivni faktor za jačinu glomerulske filtracije (OR=0,160; 95%CI=0,027-0,958; p=0,045), (tabela 14). Sa druge strane vrednosti ICAM-1 (OR=2,354; 95%CI=0,635-8,725; p=0,425), nitrata (OR=2,148; 95%CI=0,518-8,907; p=0,292), ADMA (OR=1,857; 95%CI=0,443-7,788; p=0,397) i SDMA (OR=3,040; 95%CI=0,703-13,146; p=0,137), nisu pokazale značajan uticaj na jačinu glomerulske filtracije.

Tabela 14. Ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) nakon prilagođavanja za godine za smanjenje jačine glomerulske filtracije (JGF<60 ml/min/1,73m²) u odnosu na ICAM-1, VCAM-1, nitrate (NO₂/NO₃), eNOS, ADMA, SDMA i renalazu

Parametar	OR prilagođen za godine	95%CI	p
ICAM-1 ¹ pg/ml	1,568	0,211-2,669	0,236
VCAM-1 ¹ pg/ml	4,215	1,369-11,362	p<0,05
Nitrati (μmol/l)	2,148	0,518-8,907	0,292
eNOS (pg/ml)	0,160	0,027-0,958	0,045
ADMA (μmol/l)	1,857	0,443-7,788	0,397
SDMA (μmol/l)	3,040	0,703-13,146	0,137
Renalaza (ng/ml)	6,089	1,063-34,860	0,042

¹-najviši vs najniži kvartil

U multivarijantnom modelu, nakon prilagođavanja za godine starosti (kontinuirano), ITM (kontinuirano), hipertenziju (da, ne), prisustvo šećerne bolesti (da, ne), pušenje (da, ne) i dalje su se izdvajali isti faktori rizika: koncentracija VCAM-1 (OR=5,244; 95%CI=1,369-15,559; p<0,05) i renalaza (OR=5,462; 95%CI=1,838-3,477; p=0,032), kao i eNOS-a kao protektivni faktor za jačinu glomerulske filtracije (OR=0,025; 95%CI=0,001-0,480; p=0,014). Svi rezultati prikazani su u tabeli 15. Parametri kao što su; ICAM-1 (OR=1,256; 95%CI=0,231-52,369; p=0,568), nitrati (OR=4,681; 95%CI=0,756-31,239; p=0,096), ADMA (OR=2,043; 95%CI=0,401-10,405; p=0,390) i SDMA (OR=3,747; 95%CI=0,808-17,368; p=0,091) nisu pokazali prediktivan značaj na jačinu glomerulske filtracije, takođe prikazano u tabeli 15.

Tabela 15. Multivarijantni ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) za smanjenje jačine glomerulske filtracije (JGF<60 ml/min/1,73m²) u odnosu na ICAM-1, VCAM-1, nitrate (NO₂/NO₃), eNOS, ADMA, SDMA i renalazu

Parametar	Multivarijantni OR	95%CI	p
ICAM-1 ¹ pg/ml	1,256	0,231-52,369	0,568
VCAM-1 ¹ pg/ml	5,244	1,369-15,559	p<0,05
Nitrati (μmol/l)	4,681	0,756-31,239	0,096
eNOS (pg/ml)	0,025	0,001-0,480	0,014
ADMA (μmol/l)	2,043	0,401-10,405	0,390
SDMA(μmol/l)	3,747	0,808-17,368	0,091
Renalaza (ng/ml)	5,462	1,838-3,477	0,032

Multivarijantni model - prilagođen za godine (kontinuirano), ITM (kontinuirano), hipertenzija (da, ne), šećerna bolest (da, ne), pušenje (da, ne),¹-najviši vs najniži kvartil

Kod pacijenata sa jačinom glomerulske filtracije manjom od 60ml/min/1,73m² renalaza je bila statistički značajno viša nego kod pacijenata sa glomerulskom filtracijom višom od 60ml/min/1,73m² ($p < 0,001$). Srednja vrednost koncentracije renalaze kod pacijenata u trećem stadijumu hronične bubrežne slabosti bila je 148,15±25,17 ng/ml, a kod pacijenata u četvrtom stadijumu HBI bila je 199,12±52,8 ng/ml, dok je u petom stadijumu HBI samo jedan pacijent imao vrednost renalaze 232,5 ng/ml. Postoji statistički značajna razlika u vrednostima renalaze u odnosu na stadijum bubrežne slabosti ($F=13,346$, $p < 0,001$), prikazano u tabeli 16.

Tabela 16. Koncentracija renalaze u plazmi u odnosu na jačinu glomerulske filtracije kod pacijenata sa transplantatom

Pacijenti (n)	stadijum HBI	koncentracija renalaze	sig
8	1	94,38±25,9 ng/ml	
29	2	134,82±32,44 ng/ml	
28	3	148,69±27,58 ng/ml	
7	4	199,12±52,8 ng/ml	
1	5	232,5 ng/ml	A,B,C,D,E,F

A (1vs2), B(1vs3), C (1vs4), D (2vs3), E(2vs4), F(3vs4).

U tabeli 17 prikazan je koeficijent proste linearne korelacije i pripadajuće p vrednosti između renalaze, jačine glomerulske filtracije, parametara endotelne disfunkcije i inflamacije kod pacijenata sa transplantatom. Statistički značajna inverzna korelacija uočena je između vrednosti renalaze i JGF ($r=-0,552$; $p < 0,001$), prikazano na grafikonu 2. Pozitivne korelacije su uočene između renalaze i ukupnog holesterola ($r=0,578$; $p < 0,001$), grafikon 3, renalaze i LDL-holesterola ($r=0,261$; $p < 0,05$), grafikon 4, renalaze i nonHDL-holesterola ($r=0,327$; $p=0,01$), kao i pozitivna korelacija između renalaze i kreatinina ($r=0,364$, $p=0,003$), grafikon 5. Pored renalaze holesterol je značajno korelirao, sa negativnim predznakom, još i sa jačinom glomerulske filtracije ($r=-0,332$; $p < 0,01$). Vrednosti LDL-holesterola su, osim sa renalazom, korelirali i sa non-HDL holesterolom ($r=0,473$; $p=0,01$).

Vrednosti ADMA su negativno korelirale sa vrednostima HDL-a ($r=-0,255$; $p < 0,01$) i pozitivno sa vrednostima SDMA ($r=0,514$; $p < 0,01$). Vrednosti SDMA su pored korelacije sa ADMA statistički značajno korelirale i sa vrednostima VCAM-1 ($r=0,271$;

$p < 0,05$). Renalaza nije značajno korelirala sa parametrima endotelne disfunkcije. Analizirane korelacije bile su; renalaza i ADMA ($r = -0,142$, $p = 0,255$); renalaza i SDMA ($r = -0,156$, $p = 0,210$); renalaza i ICAM-1 ($r = -0,026$, $p = 0,837$); renalaza i VCAM-1 ($r = -0,044$, $p = 0,726$), prikazano u tabeli 17.

Renalaza je pokazala inverznu korelaciju sa hemoglobinom ($r = -0,232$, $p = 0,032$); i ukupnim brojem leukocita ($r = 0,233$, $p = 0,032$); ali nije pokazala korelaciju sa godinama starosti ($r = 0,040$, $p = 0,758$); eritrocitima ($r = 0,014$, $p = 0,912$); vremenom od transplantacije ($r = -0,119$, $p = 0,349$); indeksom mase tela ($r = 0,040$, $p = 0,758$) i vrednostima CRP ($r = 0,030$, $p = 0,808$). Nije bilo statistički značajne razlike između nivoa renalaze kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na pol, ($t = 0,056$, $p = 0,955$); pušenje ($t = 1,051$, $p = 0,299$), povišen krvni pritisak ($t = 1,649$, $p = 0,123$), porekla transplantata ($t = 0,409$, $p = 0,684$) i pacijenata sa šećernom bolešću u odnosu na one bez nje ($t = 1,270$, $p = 0,219$). Nije bilo nikakve razlike u koncentracijama renalaze u odnosu na primenjenu antihipertenzivnu terapiju ($F = 0,693$, $p = 0,560$). Pomenuti rezultati nisu predstavljeni tabelarno i grafički, s obzirom da među njima nije postojala značajnost.

CRP nije pokazao korelaciju ni sa jednim ispitivanim parametrom (tabela 17).

Tabela 17. Korelaciona analiza između renalaze, lipidnih parametara, bubrežne funkcije i parametara endotelne disfunkcije i inflamacije

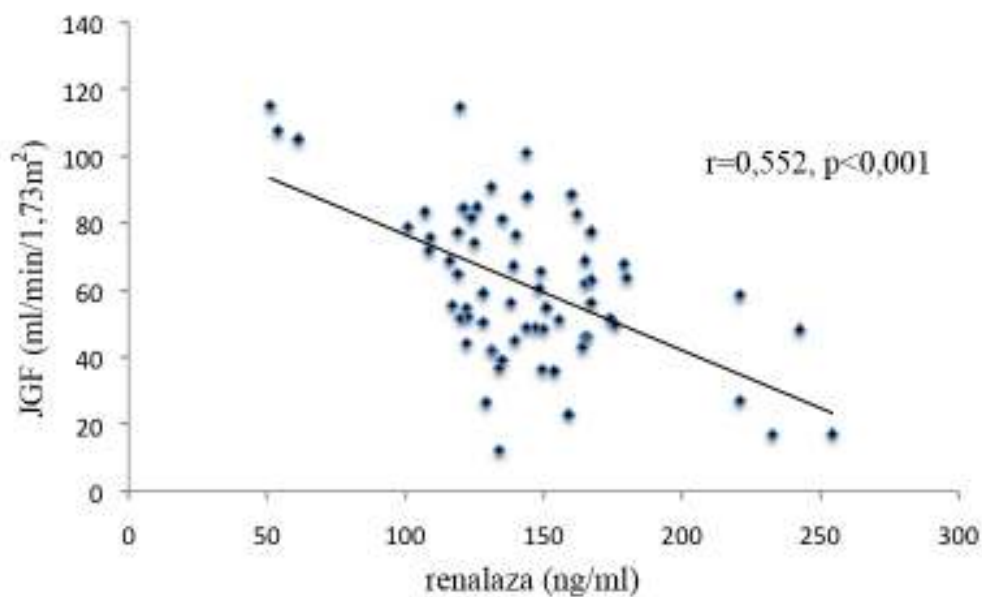
Parametar	renalaza	holesterol	JGF	kreatinin	LDL	HDL	nonHDL	ADMA	SDMA	ICAM-1	VCAM-1	CRP
renalaza	1	0,578**	-0,552**	0,364*	0,261*	0,127	0,327*	-0,150	-0,152	-0,026	-0,017	0,020
holesterol	0,578**	1	-0,332**	-0,014	0,249	0,105	0,167	-0,050	-0,139	0,051	-0,064	-0,004
JGF	-0,552**	-0,332**	1	-0,689***	-0,018	-0,221	-0,020	0,222	0,078	0,221	-0,012	0,018
kreatinin	0,364*	-0,014	-0,689***	1	-0,189	-0,164	0,098	0,034	0,235*	-0,266*	0,089	-0,110
LDL	0,261*	0,249	-0,018	-0,189	1	0,030	0,473**	-0,025	-0,119	0,069	-0,123	0,168
HDL	0,127	0,105	-0,221	-0,164	0,030	1	-0,228	-0,255*	-0,058	0,013	-0,149	0,032
nonHDL	0,327*	0,167	-0,020	0,098	0,473**	-0,228	1	0,038	0,036	-0,076	-0,028	-0,001
ADMA	-0,150	-0,050	0,222	0,034	-0,025	-0,255*	0,038	1	0,514**	0,153	0,060	-0,156
SDMA	-0,152	-0,139	0,078	0,235*	-0,119	-0,058	0,036	0,514**	1	0,088	0,271*	0,040
ICAM-1	-0,026	0,051	0,221	-0,266*	0,069	0,013	-0,076	0,153	0,088	1	0,206	0,192
VCAM-1	-0,017	-0,064	-0,012	0,089	-0,123	-0,149	-0,028	0,060	0,271*	0,206	1	0,075
CRP	0,020	-0,004	0,018	-0,110	0,168	0,032	-0,001	-0,156	0,040	0,192	0,075	1

*p<0,05;

**p<0,01;

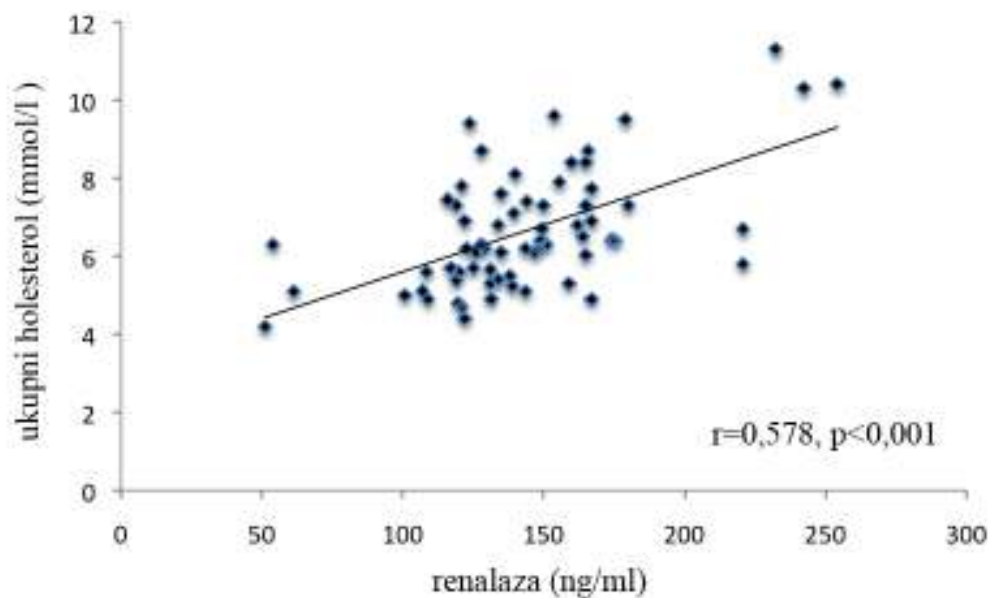
***p<0,001.

Rezultati sa statističkom značajnošću u tabeli 17, prikazani su i na grafikonima 2-5. Sa grafikona 2 uočavamo negativnu statistički značajnu korelaciju između renalaze i jačine glomerulske filtracije ($r=-0,552$; $p<0,001$).

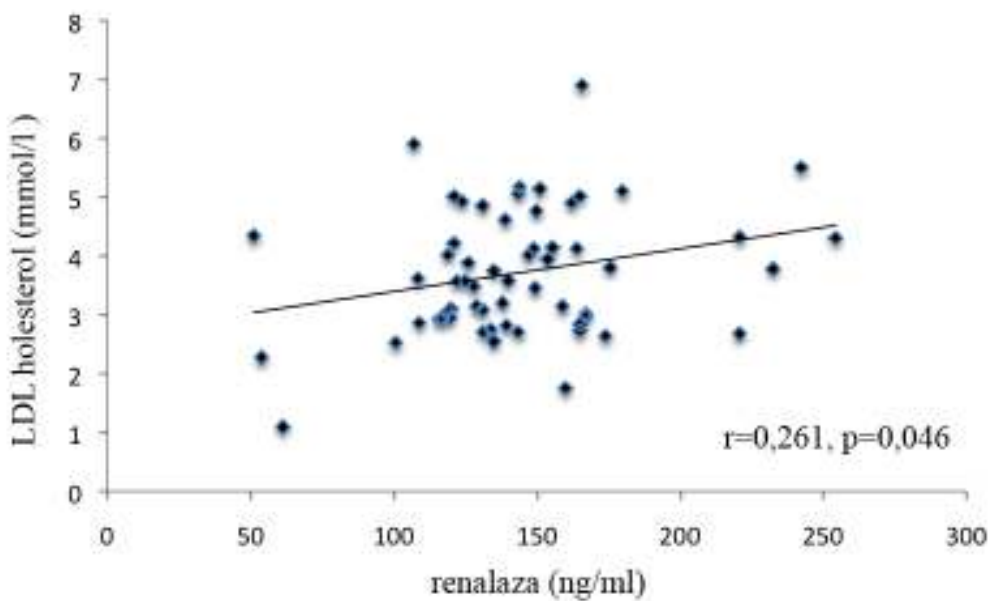


Grafikon 2. Korelaciona analiza između JGF i renalaze

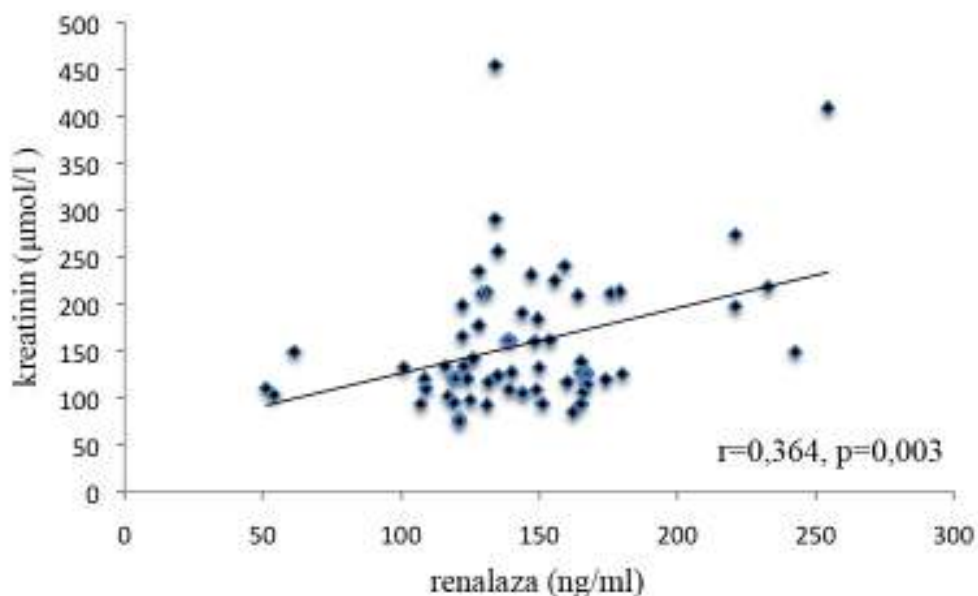
Na grafikonima 3 i 4 prikazani su korelacioni grafici renalaze i ukupnog holesterola ($r=0,578$; $p<0,001$) i renalaze i LDL-holesterola ($r=0,261$; $p=0,046$). Obe korelacije su bile pozitivne na statistički značajnom nivou. Na grafikonu 5 prikazana je međuzavisnost između renalaze i kreatinina, koja je pozitivnog karaktera i na nivou značajnosti $p<0,01$ ($r=0,364$; $p=0,003$).



Grafikon 3. Korelaciona analiza između ukupnog holesterola i renalaze



Grafikon 4. Korelaciona analiza između LDL-holesterola i renalaze



Grafikon 5. Korelaciona analiza između kreatinina i renalaze

U tabeli 18 je prikazan je koeficijent proste linearne korelacije i pripadajuće p vrednosti između parametara nitrozativnog stresa i bubrežne funkcije kod pacijenata sa transplantatom bubrega. Statistička značajnost je uočena između sledećih parametara: ADMA i SDMA ($r=0,514$, $p<0,01$), eNOS i ADMA ($r=0,453$, $p<0,05$), eNOS i SDMA ($r=0,412$, $p<0,05$), eNOS i nitrata ($r=0,508$, $p<0,05$), ADMA i nitrata ($r=0,386$, $p<0,01$) i SDMA i nitrata ($r=0,355$, $p<0,01$). SDMA je značajno korelirala i sa vrednostima kreatinina ($r=0,235$, $p<0,05$). Sve pobrojane korelacije bile su pozitivnog karaktera. Ostali parametri nisu pokazali korelaciju na statistički značajnom nivou. Nije uočena statistički značajna korelacije između renalaze i nitrata ($r=-0,145$, $t=0,274$), kao ni između renalaze i eNOS-a ($r=0,093$, $t=0,456$). Vrednosti ADMA i SDMA nisu pokazale korelaciju sa jačinom glomerulske filtracije; ADMA ($r=0,222$, $p=0,11$), SDMA ($r=0,078$, $p=0,842$), dok je SDMA pokazala značajnu korelaciju sa vrednostima kreatinina ($r=0,078$; $p<0,05$).

Tabela 18. Koeficijent korelacije između parametara nitrozativnog stresa i bubrežne funkcije kod pacijenata sa transplantatom

Parameter	Nitrati	eNOS	JGF	Kreatinin	ADMA	SDMA
Nitrati	1	0,508*	0,072	0,034	0,386**	0,355**
eNOS	0,508*	1	0,189	-0,225	0,453*	0,412*
JGF	0,072	0,189	1	-0,689***	0,222	0,078
Kreatinin	0,034	-0,225	-0,689***	1	0,034	0,235*
ADMA	0,386**	0,453*	0,222	0,034	1	0,514**
SDMA	0,355**	0,412*	0,078	0,235*	0,514**	1

*p<0,05;

**p<0,01;

***p<0,001.

U tabeli 19 predstavljeni su klinički i biohemijski parametri kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol.

Tabela 19. Klinički i biohemijski parametri kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol

	takrolimus/ MMF/pronizon	ciklosporin/ MMF/pronizon	t	p
Starost (godine)	42,43±11,19	48,78±10,44	1,087	0,062
ITM (kg/m ²)	25,59±4,37	27,07±3,68	0,342	0,254
Sistolni krvni pritisak (mm/Hg)	128,6±10,95	131,9±9,98	0,675	0,291
Dijastolni krvni pritisak (mm/Hg)	81,05±8,46	84,37±5,66	0,432	0,145
Eritrociti x 10 ¹² /l	4,79±0,77	4,49±0,64	0,121	0,162
Hemoglobin (g/dl)	13,75±2,27	12,63±1,43	0,716	0,069
Leukociti x 10 ⁹ /l	8,69±2,20	7,98±2,02	1,002	0,275
C-reaktivni protein (mg/l)	5,80(11,81)	2,46(2,98)	0,645	0,274
Ureja (mmol/l)	9,53±5,82	13,53±7,41	0,241	0,027
Kreatinin (μmol/l)	144,06±58,41	195,98±84,26	0,892	0,003

Statistički značajna razlika postojala je u koncentracijama ureje i kreatinina u odnosu na primenjeni vid imunosupresivne terapije. Pacijenti na takrolimusu imali su značajno niže vrednosti ureje (9,53±5,82 vs 13,53±7,41, p=0,027) i kreatinina (144,06±58,41 vs 195,98±84,26, p=0,003) u poređenju sa pacijentima koji su primali ciklosporinski protokol. Druge poređene vrednosti nisu pokazale značajnost: godine

($p=0,062$), indeks telesne mase ($p=0,254$), vrednosti sistolnog ($p=0,291$) i dijastolnog krvnog pritiska ($p=0,145$), broj eritrocita ($p=0,162$) i hemoglobina ($p=0,069$), leukocita ($p=0,275$) i CRP-a ($p=0,274$).

Poređenjem lipidnih parametara: ukupnog holesterola, LDL, HDL i nonHDL-holesterola i triglicerida kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol (takrolimus vs ciklosporin) nije uočena statistički značajna razlika ni u jednom od ispitivanih parametara ($p>0,05$) i to za: holesterol ($t=1,084$, $p=0,282$), LDL ($t=0,128$, $p=0,898$), HDL ($t=0,322$, $p=0,748$), non-HDL ($t=1,195$, $p=0,236$) i vrednosti triglicerida ($t=1,227$, $p=0,224$). Rezultati su prikazani u tabeli 20.

Tabela 20. Razlike u ispitivanim lipidnim parametrima kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol

Lipidni parametar	takrolimus/ MMF/pronizon	ciklosporin/ MMF/pronizon	t	p
Holesterol (mmol/l)	6,44±1,50	6,91±1,48	1,084	0,282
LDL (mmol/l)	3,73±1,13	3,77±0,96	0,128	0,898
HDL (mmol/l)	1,33±0,25	1,30±0,33	0,322	0,748
non-HDL (mmol/l)	5,18±1,47	5,68±1,57	1,195	0,236
Tg (mmol/l)	2,92±2,53	3,87±3,38	1,227	0,224

Ispitivani parametri endotelne disfunkcije, koji su prikazani u tabeli 21, takođe su poređeni u odnosu na primenjeni vid imunosupresivne terapije.

Tabela 21. Razlike u ispitivanim parametrima kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol

Parametar	takrolimus/ MMF/pronizon	ciklosporin/ MMF/pronizon	t/Z ¹	p
VCAM-1, pg/ml	686,86±50,95	673,86±46,53	0,918	0,362
ICAM-1, pg/ml	237,20±51,21	221,57±40,35	1,125	0,264
Nitrati (µmol/l)	108,42±30,60	121,38±37,40	1,110	0,285
eNOS (pg/ml)	209,59±42,01	198,43±44,54	0,892	0,376
ADMA (µmol/l)	0,54±0,11	0,52±0,13	0,554	0,586
SDMA(µmol/l)	0,82±0,29	0,84±0,44	0,192	0,850
Renalaza (ng/ml)	129,47±16,70	145,45±39,89	2,264	0,027
JGF, ml/min/1,73m ²	63,20(32,4)	52,30(47,4)	1,761 ¹	0,078

Statistički značajna razlika postojala je u vrednostima renalaze koja je kod ispitanika na imunosupresivnom protokolu sa ciklosporinom iznosila $145,45 \pm 39,89$ ng/ml i bila je značajno viša u odnosu na vrednosti kod ispitanika na terapiji takrolimusom, kod kojih su srednje vrednosti iznosile $129,47 \pm 16,70$ ng/ml ($t=2,264$; $p=0,027$). Ostale vrednosti poređenih parametara; koncentracija adhezionih molekula: VCAM-1 ($t=0,918$, $p=0,362$), ICAM-1 ($t=1,125$, $p=0,264$), nitrata ($t=1,110$, $p=0,285$), eNOS ($t=0,892$, $p=0,376$), ADMA ($t=0,554$, $p=0,586$), SDMA ($t=2,264$, $p=0,850$) i vrednosti JGF ($Z=1,761$, $p=0,078$) nisu pokazale značajnost u odnosu na kontrolu.

6.0. Diskusija

6.1. Endotelna disfunkcija u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom

Transplantacija bubrega je danas, svakako, najbolji modalitet lečenja pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne bolesti. Iako se simptomi i znaci uremijske intoksikacije najvećim delom povlače nakon transplantacije, elementi endotelne disfunkcije su i dalje prisutni. Većina istraživača smatra da se endotelna funkcija ne popravlja zbog neželjenih efekata imunosupresivne terapije. Dokazano je da je endotelna disfunkcija ključni patofiziološki proces u razvoju ubrzane ateroskleroze kod ovih pacijenata.¹⁹⁸ Svakako da ovome doprinosi održavanje uremijske intoksikacije kod jednog broja pacijenata.¹⁹⁹ Ovome ide u prilog i činjenica da određeni kardiovaskularni faktori rizika vezani za uremiju, još uvek postoje i nakon uspešne transplantacije bubrega.^{200,201}

Literaturni podaci u najvećem broju slučajeva navode da se stepen endotelnog oštećenja smanjuje sa dužinom posttransplantacionog perioda,²⁰² odnosno da je endotelna disfunkcija u inverznom odnosu sa vremenom nakon transplantacije. Smatra se da visoke doze imunosupresiva date odmah nakon transplantacije (sa ciljem prevencije akutnog odbacivanja) imaju štetniji efekat nego kumulativna doza kalcinurinskih inhibitora u dužem vremenskom periodu.²⁰³

Dobijeni rezultati u ovom istraživanju slažu se sa rezultatima većine istraživača,^{200,204-206} jer su i kod ispitanika kliničke grupe parametri endotelne disfunkcije (direktni i indirektni) značajno viši u odnosu na kontrolu.

Nakon transplantacije značajno se smanjuje nivo uremijske intoksikacije, retencije tečnosti, popravljaju se elektrolitni balans i anemijski sindrom. Takođe se značajno smanjuje oksidativni stres, mada je dokazano da je endotelna funkcija merena kao bioraspoloživost azot oksida još uvek smanjena. Svakako da glavnu ulogu u smanjenju bioraspoloživosti NO imaju imunosupresivi, jer ciklosporin dovodi do povećane produkcije slobodnih radikala koji interferiraju sa metabolizmom NO, a

istovremeno i ciklosporin i takrolimus blokadom kalmodulina sprečavaju dalju produkciju NO.

6.1.1. Adhezioni molekuli kao parametri inflamacije kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na kontrolnu grupu

Inflamacija i endotelna disfunkcija igraju najznačajnije uloge u inicijaciji, progresiji i propagaciji aterosklerotskog procesa. Ovaj proces je omogućen zahvaljujući ekspresiji celularnih adhezivnih molekula na membrani endotelnih ćelija. Oni deluju kao medijatori inflamacije i njihovo dejstvo je naročito izraženo tokom uremijske intoksikacije. Ekspresija svih (visoko i nisko afinitetnih) adhezivnih molekula nastaje usled snažne stimulacije različitim proinflamatornim citokinima. Identifikacija adhezivnih molekula koji imaju ulogu u kaskadnom procesu inflamacije može imati značajnu ulogu u imunskoj terapiji nakon transplantacije.

Na našem uzorku merene su solubilne koncentracije adhezivnih molekula ICAM-1 i VCAM-1 u plazmi. Dokazano je da su povišene u odnosu na zdravu kontrolu, što je u korelaciji sa najvećim brojem literaturnih podataka. Većina istraživača je i imunohistohemijskim bojenjem dokazala tkivnu ekspresiju ovih molekula na alograftu. Najznačajnija distribucija je verifikovana na intertubularnim kapilarima i većim krvnim sudovima, kao i u područjima sa leukocitnom infiltracijom. Intracelularni adhezivni molekuli su konstitutivno ekspimirani na nivou čitavog endotela glomerula, dok su tubuli negativni za ovu ekspresiju. Nakon transplantacije ekspresija ICAM-1 molekula je detektovana i na proksimalnim tubulima, naročito na nivou *brush border-a*. VCAM-1 molekuli su konstitutivno ekspimirani na nivou parijentalnih ćelija Bowmanove čaure, na distalnim tubulima ih nema, dok je fiziološki moguća manja ekspresija na nivou proksimalnih tubula. U transplantiranom bubregu snažno su ekspimirani na endotelu intratubularnih kapilara, velikim krvnim sudovima, kao i na nivou distalnih tubula. *In vitro* istraživanjima je dokazano da ova ekspresija na nivou tubularnih ćelija može da poveća infiltraciju limfocita i da na taj način učestvuje u procesu odbacivanja grafta. Dokazano je da je koncentracija ovih molekula u pozitivnoj korelaciji sa hroničnim odbacivanjem grafta. Imunosupresivna terapija, naročito ciklosporin, može da poveća

ekspresiju ovih molekula.¹⁴² Mogućnost njihovog merenja u biološkim tečnostima, urinu ili plazmi, omogućava lakše i komfornije praćenje pacijenata nakon transplantacije. Povišene vrednosti ovih molekula zabeležene su i u slučajevima akutnog odbacivanja grafta, čime je omogućena diferencijacija od klasične nefrotoksičnosti. Merenje ovih adhezionih molekula u urinu može biti rani marker disfunkcije grafta. Povećanje koncentracije adhezionih molekula je verovatno posledica njihovog smanjenog klirensa u uslovima neadekvatne funkcije grafta. Dokazano je i da je koncentracija VCAM-1, ali ne i ICAM-1, molekula bila značajno viša kod pacijenata nakon transplantacije koji su imali prethodnu istoriju kardiovaskularne bolesti. Međutim, kod pacijenata nakon transplantacije samo VCAM-1 molekuli su kao izdvojili kao prediktori sveukupnog mortaliteta²⁰⁷ (identifikovani su kao nezavisni i kao prediktori mortaliteta nakon prilagođavanja za godine i faktore rizika), ali nije detektovana razlika u koncentraciji ovih molekula u odnosu na uzrok smrti.

U grupi pacijenata sa dijabetesnom nefropatijom, u peritransplantacionom periodu, bojenjem tkiva krvnih sudova bubrega, izolovani su isključivo VCAM-1, što je ukazivalo da ovi molekuli mogu biti rani markeri aterosklerotske lezije kod pacijenata sa bubrežnom bolešću.²⁰⁸ Dokazano je da su obe vrste adhezionih molekula eksprimirane na endotelu u regijama sklonim nastanku ateroskleroze.¹⁴⁵ VCAM-1 predominantno su eksprimirani u aterosklerotski izmenjenom endotelu, dok su ICAM-1 eksprimirani u nezahvaćenju aorti i tzv. „zaštićenim” regijama.¹⁴⁵ Nije zabeleženo da deficit ICAM-1 molekula utiče na rani proces formiranja lezije „penastih ćelija”, dok je nedostatak VCAM-1 molekula bio povezan sa njihovim gubitkom. Zato je pretpostavljeno da zapravo VCAM-1 ima glavnu i presudnu ulogu u formiranju aterosklerotskog plaka.²⁰⁹ Razlika u ekspresiji ukazuje na različite funkcije adhezionih molekula u inicijaciji lezije. Endotelna ekspresija VCAM-1 molekula je pod *up regulacijom* hiperholesterolemije i dokazana je kod ApoE^{-/-} miševa i pre formiranja lezije.¹⁴⁵ Lokalno oksidisani lipoproteini zarobljeni u intimi mogu da generišu različite proinflamatorne faktore koji indukuju ekspresiju adhezionih molekula.¹⁴⁶ Dokazano je da je uticaj proinflamatornih faktora u ekspresiji VCAM-1 bolje kontrolisan nego na ICAM-1.¹⁴⁶ Svi podaci ukazuju na to da je u formiranju aterosklerotskog plaka zapravo ključna uloga VCAM-1 u odnosu na ICAM-

1 molekule, te da su detektovani u svim stanjima koja u svojoj osnovi imaju proces inflamacije i endotelne aktivacije.

Shodno tome povišeni nivoi ovih molekula su opisani i kod pacijenata sa stabilnom anginom pektoris, akutnim koronarnim sindromom, hipertenzijom,²¹⁰ autoimunim bolestima, kao i kod pacijenata u terminalnim fazama bubrežne bolesti²¹¹ i na dijalizi.²¹¹ U ovoj grupi su dokazani i kao nezavisni prediktori mortaliteta.^{212,213}

Vrednosti C-reaktivnog proteina, kao akutnog markera inflamacije, nisu se značajno razlikovale kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na zdrave ispitanike. Međutim, ima i podataka da se vrednosti C-reaktivnog proteina nakon transplantacije smanjuju u odnosu na pacijente na dijalizi, ali da i dalje ostaju više u odnosu na kontrolu. Analizom naših rezultata zaključeno je da CRP nije „najbolji“ marker za procenu inflamacije kroz duži posttransplantacioni period i da je moguće da su drugi markeri (serumski amiloid A ili visoko senzitivni-*hsCRP*) bolji u ovoj proceni. *High sensitive CRP* je opisan kao biomarker koji ima najbolju inverznu korelaciju sa dilatacijom brahijalne arterije, kod svih pacijenata sa bubrežnom bolešću, uključujući i pacijente nakon transplantacije. Osim toga on je opisan i kao nezavisni prediktor funkcije grafta nakon transplantacije.

Ubrzana ateroskleroza verovatno leži u osnovi bubrežne disfunkcije kod pacijenata nakon uspešne transplantacije bubrega i ovi markeri ateroskleroze bi mogli da ukažu na stepen bubrežnog oštećenja. Oni se, međutim, ne mogu smatrati potpuno specifičnim, jer do porasta njihovih koncentracija dolazi i kod endotelne disfunkcije, hroničnog odbacivanja transplantata, tokom imunosupresivne terapije. To smanjuje njihov dijagnostičko-prognostički značaj.

6.1.2. Lipidni status nakon transplantacije

Hiperlipidemija koja se javlja nakon uspešne transplantacije bubrega je česta i perzistentna komplikacija. Značajno doprinosi kardiovaskularnom morbiditetu i mortalitetu, a dovodi i do hronične vaskulopatije grafta. Iako se zna da različiti epidemiološki i klinički faktori učestvuju u nastanku hiperlipidemije, patogeneza ovog procesa je multifaktorska i nerazjašnjena u potpunosti. Naši rezultati o lipidnom statusu kod pacijenata nakon transplantacije u poređenju sa kontrolom koreliraju sa većinom

literaturnih podataka. Verifikovana hiperholesterolemija je uključivala povećanje LDL i nonHDL-holesterola, dok se vrednosti HDL-holesterola nisu razlikovale značajno u odnosu na kontrolu. Takođe su postojale značajne razlike u vrednostima triglicerida u poređenju sa kontrolom, kao i promene u svim lipoproteinskim odnosima. Kao najznačajniji faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih događaja opisani su porast ukupnog i LDL-holesterola, kao i povećanje koncentracije triglicerida.²¹⁴ Najveći broj kliničkih studija u opštoj populaciji je pokazao da upotreba antilipemične terapije, u regulaciji hiperholesterolemije, značajno smanjuje incidenciju za razvoj kardiovaskularnih bolesti.²¹⁵⁻²²⁰ To je takođe dokazano i u velikoj, randomizovanoj, multicentričnoj *ALERT* studiji, sa učešćem 2102 pacijenta nakon transplantacije bubrega.²²¹

Nakon transplantacije bubrega opisani faktori rizika za nastanak hiperlipidemije su godine pacijenta, telesna masa, lipidni status pre transplantacije, ali i faktori kao što su proteinurija ili disfunkcija kalema. Većina istraživača, ipak, smatra da imunosupresivna terapija najviše doprinosi razvoju hiperlipidemije.²²² Povišene vrednosti ukupnog i LDL-holesterola viđaju se kod 60% pacijenata nakon transplantacije, hipertrigliceridemija kod 35%, a niže vrednosti HDL-holesterola kod 15% pacijenata.²²³ Neke prospektivne studije su pokazale da su pacijenti koji su tretirani ciklosporinom i pronizonom imali porast ukupnog holesterola, na račun njegovih frakcija (LDL i HDL), dok su koncentracije triglicerida bile nepromenjene. Ove studije su ukazale da je zapravo najaterogenija lipidna komponenta LDL-holesterol, s obzirom na to da je podložan različitim vrstama modifikacija (oksidacija, karbamilacija), koje potenciraju njegovu aterogenost.^{223,224} Neke od studija su pokazale da takrolimus ima manji uticaj na lipidni profil.²²⁵ Hiperholesterolemija je povezana sa nastankom posttransplantacione vaskularne bolesti bubrega,²²⁶ a ista studija je pokazala da je za razvoj ishemijske bolesti srca od svih evaluiranih lipidnih parametara najznačajnija bila snižena koncentracija HDL-holesterola.²²⁷ Generalni zaključak je, ipak, da su najznačajniji faktori rizika, koji su nakon prve posttransplantacione godine udvostručivali rizik za razvoj neželjenog kardiovaskularnog događaja bili vrednost ukupnog holesterola, iznad 5,17 mmol/l ili triglicerida viša od 3,95 mmol/l.²²⁸ Neki autori smatraju da, u populaciji pacijenata nakon transplantacije bubrega, rizik za kardiovaskularnu bolest postoji čak i kod koncentracija

totalnog holesterola viših od 4,6 mmol/l.²²⁹ Studija petogodišnjeg praćenja nakon transplantacije je pokazala da se vrednost ukupnog holesterola izdvaja kao snažan i nezavistan prediktor za sve vrste kardiovaskularnih događaja, uključujući i ukupno preživljavanje.²²⁹

Većina autora se slaže da izmenjen metabolizam lipida kod pacijenata sa transplantatom nastaje kao posledica smanjenog katabolizma hilomikrona i endogenih lipoproteinskih partikula, te se ostaci hilomikrona, VLDL i LDL nagomilavaju u plazmi. Ostale promene podrazumevaju posttranslacionu modifikaciju apolipoproteina i to putem glikacije, oksidacije i karbamilacije. Ovako modifikovani lipidi onemogućavaju preuzimanje LDL-holesterola od strane receptora na hepatocitima i dovode do porasta njihovih koncentracija.

Deo naših rezultata, koji ne korelira sa rezultatima drugih istraživača, jesu nepromenjene vrednosti HDL-holesterola u odnosu na zdravu populaciju. To se može objasniti podacima iz drugih studija, koje su dokazale da u stanjima akutne inflamacije HDL-holesterol u potpunosti gubi zaštitnu ulogu i postaje proinflamatorni molekul. Nakon vezivanja, serumski amiloid A, kao protein akutne faze, paradoksalno čini HDL-holesterol proaterogenom partikulom. Ovakva transformacija je dokazana u stanju uremije. Iz tog razloga HDL-holesterol u populaciji pacijenata nakon transplantacije bubrega još uvek se ne može smatrati protektivnim agensom.

Međutim, većina protokola za kontrolu i lečenje pacijenata nakon transplantacije bubrega preporučuje upotrebu antilipemične terapije i agresivno obaranje koncentracije holesterola, sa istovremenim efektom na porast HDL-holesterola. To za sobom povlači pitanje opravdanosti ovakvog pristupa i pitanje neophodnosti pažljivog doziranja antilipemika ukoliko postoji smanjena funkcija grafta.

6.1.3. Koncentracije dimetilarginina kod pacijenata nakon uspešne transplantacije bubrega

Određivanje koncentracije dimetilarginina, kao uremijskih toksina, može biti od velikog značaja u praćenju pacijenata nakon transplantacije bubrega. Dobijeni rezultati ukazuju da su njihove koncentracije (ADMA i SDMA) značajno više u odnosu na kontrolnu grupu. Podaci iz literature pokazuju da su, neposredno nakon operativnog

zahvata (čak i u odsustvu akutnog odbacivanja grafta), koncentracije dimetilarginina značajno povišene u odnosu na kontrolu.²³⁰ Destrukcija tkiva, tokom transplantacije bubrega, podrazumeva degradaciju proteina i nagomilavanje njihovih metilisanih produkata. Time se objašnjava nagli skok dimetilarginina neposredno nakon transplantacije, dok sa uspostavljanjem funkcije grafta dolazi do njihovog smanjenja. Praćenje koncentracija ADMA i SDMA ukazalo je da su 4 nedelje nakon transplantacije njihove koncentracije značajno niže, da ostaju niže u prvim mesecima,²³¹ ali da su i dalje više u odnosu na populaciju zdravih ispitanika.²³² ADMA je nakon transplantacije značajno niža nego tokom dijalize, iako je dokazano da se 60% ADME eliminiše procesom hemodijalize.²³¹

Ovakav rezultat je posledica oporavka funkcije endotela, manifestovanog kroz sintezu i oslobađanje NO.²³³ Nemogućnost potpune reparacije verovatno zavisi od dužine dijaliznog perioda i ireverzibilnih promena endotela tokom dugotrajnog uremijskog miljea, usled ishemijsko-reperfuzionog oštećenja, kao i činjenice da obavezna imunosupresivna terapija dovodi do daljeg oštećenja. Iako se koncentracije ADME smanjuju, smatra se da su one i dalje dovoljno visoke da onemogućavaju potpunu restituciju endotela, doprinose razvoju kardiovaskularnih bolesti i povećanju morbiditeta i mortaliteta u grupi pacijenata sa transplantatom. Većina autora smatra da patofiziološki mehanizmi kojima se održavaju visoke vrednosti ADME u plazmi i nakon transplantacije uključuju: porast procesa metilacije proteina i/ili izraženu proteolizu, kompromitovanu ekskretornu funkciju bubrega (smanjen klirens ADME) i smanjenje aktivnosti DDAH. Za tačnu diferencijaciju patofizioloških mehanizama neophodno je utvrditi S-adenozilmetionin/S-adenozil homocistein odnos, mada postoje i studije koje su dokazale visoke vrednosti ADME čak i uz smanjenu aktivnost metilacije u odnosu na kontrolu.²³⁴ Druge studije su ukazale da porast telesne težine nakon transplantacije može biti u direktnoj vezi sa povišenim vrednostima ADME i da smanjenje protektivnog efekta adiponektina dovodi do povećanja kardiovaskularnog rizika.^{235,236} Takođe je dokazano da je koncentracija ADME značajan faktor rizika za gubitak funkcije grafta, tako da bi ADMA mogla da bude prediktor morbiditeta, mortaliteta i gubitka funkcije grafta nakon transplantacije.¹⁰⁶

S druge strane, istraživanjem koje se nadovezalo na *ALERT* studiju, je dokazano da je ADMA nezavistan prediktor za *major adverse cardiovascular events*, (*MACE*), iznenadnu srčanu smrt, infarkt miokarda bez smrtnog ishoda, sveukupan mortalitet i gubitak bubrežne funkcije kod pacijenata nakon transplantacije bubrega.¹⁰⁶

Epidemiološke studije su ustanovile vezu između ADME i hipertenzije, hiperholesterolemije,⁶⁰ dijabetes melitusa²³⁸ i povišenog kardiovaskularnog rizika kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom bolešću.^{239,240} Rezultati ovih studija ukazuju na to da je najznačajniji efekat ADME zapravo gubitak endotelne funkcije.²⁴¹

Kod pacijenata nakon transplantacije bubrega endotelna disfunkcija će dovesti do funkcionalnih, a zatim i strukturnih oštećenja krvnih sudova,^{242,243} a ova lezija je dodatno potencirana upotrebom imunosupresivne terapije.²⁴⁴

Kod pacijenata nakon transplantacije srca takođe su izmerene više vrednosti ADME i one su pozitivno korelisale sa hiperplazijom tunike intime koronarnih krvnih sudova.²⁴⁵ Pretpostavlja se da iste promene postoje i na renalnoj vaskularnoj mreži i kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Povišene koncentracije ADME nakon transplantacije povećavaju rizik za nastanak cerebrovaskularnog infarkta nekoliko puta u odnosu na zdravu populaciju.²⁴⁶ Istraživanja u populaciji zdravih ispitanika su pokazala da administracija ADME dovodi do krutosti krvnih sudova, kao i do redukcije moždanog protoka, te da ADMA na taj način učestvuje u patogenezi endotelnog oštećenja.²⁴⁷ Ovakva korelacija je dokazana i u populaciji pacijenata nakon transplantacije bubrega.¹⁰⁶

Visoke koncentracije ADME postoje kod svih pacijenata kod kojih je kompromitovana funkcija bubrega, bez obzira na etiologiju oštećenja. Ovaj porast je najveći u terminalnom stadijumu bubrežne bolesti (čak i sedmostruki). Dokazano je da nakon transplantacije recipijenti sa većim brojem komorbiditeta imaju više koncentracije ADME u odnosu na pacijente samo sa bubrežnom bolešću.¹⁰⁶ Većina autora smatra da su visoke koncentracije ADME najznačajniji činioc u patogenezi arterijske hipertenzije kod pacijenata nakon transplantacije bubrega. Intravenozna administracija ADME zdravim pojedincima dovodi do istovremenog porasta njenih serumskih vrednosti, (od 0,95 $\mu\text{mol/l}$ do 23 $\mu\text{mol/l}$) i do porasta krvnog pritiska. Sa porastom pritiska, dolazi i do značajnog smanjenja u ekskreciji natrijuma, smanjenja efektivnog renalnog protoka i porasta totalnog vaskularnog otpora u bubregu. Smatra se da ADMA smanjuje renalne

koncentracije NO i dovodi do porasta reaktivnih kiseoničnih vrsta, sa posledično povećanom reapsorpcijom soli i vode. Sa druge strane ADMA deluje vazokonstriktorno i povećava periferni vaskularni otpor, a zbog nedostatka azot monoksida smanjuje se NO zavisna relaksacija krvnih sudova. Nastaju promene u intraglomerulskoj hemodinamici sa remećenjem tubulo-glomerulske regulacije i izmenjene bubrežne adaptacije na dejstvo simpatikusa (simpatička hiperaktivnost).

SDMA se u potpunosti elimiše putem bubrega i smatra se ranim indikatorom promena u jačini glomerulske filtracije.²³⁰ Pozitivno korelira sa različitim parametrima bubrežne funkcije.²³⁰ Njene vrednosti rastu paralelno sa kreatininom i dokazano je da u nekim slučajevima pokazuju čak veću senzitivnost nego sam kreatinin. Kod pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne bolesti vrednosti SDMA u plazmi su oko osam puta veće u odnosu na vrednosti ADMA. Za sada se još uvek ne zna na koji način visoke vrednosti SDMA mogu da utiču na funkciju grafta. Patofiziološko objašnjenje je da SDMA dovodi do endotelnog oštećenja tako što indirektno interferira sa metabolizmom NO,²⁴⁸ (umesto što direktno blokira eNOS). Takođe postoje pretklinički dokazi da SDMA stimuliše produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta u monocitima, te da na taj način oštećuje endotel.²⁴⁹ Opisano je i da se u akutnoj inflamaciji vrednosti ADME mogu smanjiti, ali ne i SDMA. SDMA je predložen kao biomarker koji bi mogao da zameni kreatinin, ali mu za pravu kliničku upotrebu nedostaju senzitivnost i specifičnost

S obzirom da su dimetilarginini identifikovani kao opšti faktori rizika nameće se potreba za eksperimentalnim, ali i kliničkim ispitivanjem potencijalnog farmakološkog tretmana za njihovo smanjenje. Za sada se pretpostavlja da valsartan, amlodipin i rozigitazon mogu da dovedu do smanjenja koncentracije ADME i potencijalno poprave funkciju endotela.²⁴⁵

6.1.4. Koncentracije eNOS i nitrata kod pacijenata nakon uspešne transplantacije bubrega

Dokumentovano je da oksidativni stres ima veći uticaj na funkciju grafta u odnosu na nitrozativni. Ipak, različiti faktori koji su direktno ili indirektno povezani sa metabolizmom azot monoksida mogu imati značajan uticaj na funkciju transplantiranog

bubrega. U eksperimentalnom modelu insuficijencije bubrega, smanjeni bubrežni protok plazme i smanjena jačina glomerulske filtracije su bili povezani sa smanjenjem koncentracije L-arginina, smanjenom ekspresijom eNOS-a i smanjenom sintezom NO.²⁵⁰ Dokazano je NOS može imati istovremeno proinflamatorni i antiinflamatorni efekat, što najviše zavisi od mikrokruženja na nivou bubrežnog tkiva. NO mogu sintetisati podjednako endotelne, epitelne i inflamatorne ćelije. Većina autora smatra da je za normalno funkcionisanje grafta od najveće važnosti produkcija NO, uz učešće eNOS-a. (dokazano je da eNOS deluje inhibitorno na iNOS, koji aktivira citotoksičnost makrofaga). To je prvo dokazano nakon transplantacije srca,²⁵¹ gde je deficijencija eNOS-a bila povezana sa kasnijim razvojem arterioskleroze grafta. Osim toga opisana je hipertenzija kod pacijenata sa urođenim deficitom eNOS-a.²⁵²

Zna se da je biorasploživost azot monoksida redukovana usled njegove slabije produkcije ili zbog povećane degradacije. Smanjeno stvaranje azot monoksida je posledica slabije aktivnosti eNOS-a: 1) usled nedostatka L-arginina kao supstrata²⁵³ ili 2) zbog deficijencije BH₄ kao kofaktora.²⁵⁴ Deficit L-arginina nastaje delovanjem kompetitivnog inhibitora za eNOS, ADME, a deficit BH₄ usled ishemijsko-reperfuzionog oštećenja tokom transplantacije. Transplantacija kao operativna procedura na prvom mestu remeti integritet endotela.

Većina autora smatra da je glavni razlog za smanjenje biorasploživosti NO nakon transplantacije posledica delovanja reaktivnih kiseoničnih vrsti, koje se u najvećoj meri stvaraju tokom ishemijsko-reperfuzionog oštećenja. Ishemija, a naročito reoksigenacija, značajno oštećuju nekoliko bitnih metaboličkih puteva u bubregu i dovode do masivne produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsti. Ovi novostvoreni slobodni radikali dovode do snažne razgradnje NO, a ukoliko postoji deficit BH₄, (bilo koje etiologije), zaštitna uloga eNOS-a se gubi. eNOS tada, umesto da stvara NO, počinje produkciju O₂⁻, sa daljim oštećenjem endotela. Znatne količine slobodnih radikala, nakon transplantacije, su zapravo stvorene zahvaljujući eNOS-u, naročito kod pacijenata kod kojih je verifikovana hiperholesterolemija. Blokada sinteze BH₄ kod pacijenata nakon transplantacije srca je dovela do povećane produkcije slobodnih radikala i recipročne redukcije u aktivnosti eNOS-a. Osim toga, reaktivne kiseonične vrste, ukoliko su u višku, snažno reaguju sa azot monoksidom, te dolazi do stvaranja vrlo toksičnog peroksinitrita, ONOO⁻. Ovaj

slobodni radikal je opisan kao najznačajniji biooksidant, koji dovodi do lipidne peroksidacije i oštećenja proteina, DNK i lipida. Ovako modifikovani eNOS nakon transplantacije, dovodi do mnogo većih oštećenja vaskulature grafta, nego njegovog parenhima. Eksperimentalno je dokazano da je intravenska administracija superoksid dismutaze, pre reperfuzije, dovela do bolje očuvanosti funkcije grafta.

Kod ispitanika nakon transplantacije plazmatske koncentracije NO i aktivnost eNOS-a su bili značajno viši nego u kontroli sa razlikom u odnosu na publikovane rezultate. Ovaj porast možemo da tumačimo na dva načina. Prvi, da je to kompenzatorni odgovor endotela na delovanje velikog broja različitih toksičnih supstanci, što ukazuje da još uvek postoji određena funkcionalna rezerva ove strukture. Drugo, da je generisanje NO i eNOS-a odgovor inflamatornih ćelija u slučaju postojanja hronične inflamacije, merenjem adhezivnih molekula, dokazana i u našoj grupi pacijenata. Ovoj tvrdnji idu u prilog podaci da nakon suplementacije BH₄ ili dodavanja L-arginina dolazi do poboljšanja funkcije grafta. Još uvek nema dokaza o efektima dugotrajne suplementacije BH₄ na preživljavanje grafta. Takođe, rezultati sa suplementacijom L-arginina u humanoju populaciji su kontroverzni. Neke studije su dokazale da dodavanje L-arginina pacijentima u postransplantacionom periodu deluje pozitivno hemodinamski. Opisani efekti su: poboljšana glomerulska filtracija i perfuzija,²⁵⁵ smanjenje krvnog pritiska²⁵⁶ i poboljšana natriureza kod pacijenata na ciklosporinu.²⁵⁷ S obzirom da hiperholesterolemija, na račun povišenog LDL-holesterola, stvara milje pogodan za oksidativne modifikacije NO i eNOS-a, pacijentima nakon transplantacije se takođe preporučuje agresivna antilipemična terapija.

Ovi rezultati dovode u pitanje ulogu ADME kao kompetitivnog inhibitora eNOS-a, gde bi se sa porastom njenih koncentracija očekivao snažan pad eNOS-a i NO. Dve nezavisne studije su pokazale da ADMA u plazmi ne može adekvatno da reflektuje njihove koncentracije na nivou bubrežnog tkiva. Obe studije su ukazale da endogeni metilarginini mogu imati i dodatni protektivni efekat u zavisnosti od organskog sistema. ADMA, osim eNOS-a, na identičan način blokira i iNOS, koji potencira citotoksičnost makrofaga, te se njen protektivni efekat može razmatrati u ovom kontekstu. Još uvek, prema nekim autorima, postoji dilema da li se radi o biomarkeru sa prognostičkim efektom, faktoru rizika ili medijatoru.

Iz ovih razloga neophodno je dalje praćenje svih parametara nitrozativnog stresa, najviše iz razloga dobre diferencijacije citoprotektivnog i citooksidativnog efekta azot monoksida.

6.2. Koncentracije renalaze kod pacijenata sa transplantiranim bubregom i međusobne korelacije svih ispitivanih parametara

Povećana aktivnost simpatičkog nervnog sistema je jedan od bitnih predisponirajućih faktora za obolevanje od kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa hroničnim bubrežnim oštećenjem.^{258,259} Dokazano je i da pacijenti nakon transplantacije bubrega imaju 2 do 5 puta veću incidenciju za razvoj kongestivne srčane insuficijencije u poređenju sa zdravom populacijom.²⁶⁰ Hipertrofija leve komore je opisana kod 50-70% pacijenata sa transplantiranim bubregom i važan je prognostički indeks za mortalitet ovih pacijenata.^{261,262} Smatra se da povećane koncentracije plazmatskih kateholamina prestimulišu adrenergičke receptore, uzrokujući hipertrofiju leve komore i razvoj srčane insuficijencije.²⁵⁸ Perzistentna hiperaktivnost simpatikusa može da bude uzrok, ali i posledica primarnog oštećenja bubrega u koje su uključena dva patogenetska mehanizma. Prvi je vezan za direktno dejstvo uremijskih toksina na aferentne simpatičke nervne završetke bubrega, a drugi je nezavistan od uremijske intoksikacije i porekla je iz samog oštećenog bubrežnog parenhima.²⁶³

Uremijski toksini se nagomilavaju u terminalnoj fazi bubrežne bolesti i ne mogu biti u potpunosti eliminisani dijalizom. Kontinuirano prisutni u organizmu odgovorni su za aktivaciju aferentnih puteva iz bubrega i snažnu stimulaciju centralnih simpatičkih jedara rezultujući hipertenzijom (bubreg je, pored miokarda, organ sa najizraženijom eferentnom inervacijom). Aferentni nervi mogu biti stimulisani i preko baro ili hemoreceptora što je najčešće u toku procesa inflamacije ili ishemije. Impulsi se prenose duž renalne arterije i ulaze u bočne rogove kičmene moždine na nivou Th₆-L₃, odakle putuju do simpatičkih jedara u centralnom nervnom sistemu. Neurotransmiteri koji se oslobađaju na krajevima nervnih završetaka su noradrenalin, ATP i supstanca P i sa izraženim su vazokonstriktornim dejstvom. Na animalnom modelu bubrežne insuficijencije dokazano je da nakon dorzalne rizotomije (selektivna blokada

subdijafragmalnih aferentnih nerava) došlo do pada sistemskog pritiska,²⁶⁴ a u modelu subtotalne nefrektomije istom procedurom je takođe normalizovan krvni pritisak. Na istom modelu intrarenalna aplikacija fenola dovela je do trenutnog skoka noradrenalina iz posteriornog hipotalamusa i prevenirana je postupkom renalne denervacije.²⁶⁵

Sličan patogenetski mehanizam aktivacije simpatikusa, preko aferentnih nerava, objašnjava visoke vrednosti pritiska i kod pacijenata nakon transplantacije. Simpatička hiperaktivnost je dokazana merenjem MSNA (muscle nerve sympathetic activity).²⁶³ Smatra se da je povećan tonus bubrežnih aferentnih nerava, u stanju bez uremične intoksikacije, posredovan signalima iz bolesnog, nefrektomisanog, „starog“ bubrega.²⁶⁶ Ova tonička ekscitacija renalnih aferentnih nerava nastaje zbog fibroproliferativnog oživljavanja bolesnog bubrega²⁶⁷ ili zbog lokalne ishemije i potencijalnog oslobađanja medijatora, adenzina.^{268,269} Iz jedara centralnog nervnog sistema polaze simpatička eferentna vlakna do jukstaklomerulskog aparata bubrega, čime započinje aktivacija renin angioenzin aldosteron sistema preko β 1-adrenergičkih receptora. S druge strane stimulacijom α 2-adrenergičkih receptora povećava se reapsorpcija natrijuma na nivou proksimalnih tubula. Eferentna vlakna iz centralnog nervnog sistema deluju, osim na bubrege i na ostale ciljne organe: na vaskulaturu, srčani mišić i na jetru. Smatra se da hipertrofija miokarda leve komore nastaje usled direktne stimulacije α i β adrenergičkih receptora i prisutnog sistolnog i dijastolnog opterećenja. Jedan od pokazatelja značaja aktivacije sistema renin angiotenzin aldosteron sistema u nastanku insuficijencije disfunkcije ciljnih organa je smanjenje simpatičkog tonusa nakon terapije ACE inhibitorima.²⁷⁰ Smatra se da je bubrege *pace-maker* simpatičke aktivnosti, koja zavisi od odnosa između angiotenzina II, kao moćnog vazokonstriktora i NO, kao značajnog vazodilatatora.

Dokazano je da kalcineurinski inhibitori, posebno ciklosporin²⁷²⁻²⁷⁴, takođe mogu biti snažni aktivatori simpatičke aktivnosti.²⁷¹ Bez obzira na korekciju uremije, kod pacijenata nakon transplantacije postoji povećana aktivnost simpatikusa i ona nije značajno različita od ove aktivnosti kod pacijenata na dijalizi. Međutim, vrednosti MSNA su izjednačene sa kontrolnom grupom kod onih pacijenata gde je urađena bilateralna nefrektomija.²⁶³ Većina pacijenata sa transplantatom nikada ne povratu kompletnu funkciju bubrega i najčešće ostaje na nivou trećeg ili četvrtog stadijuma hronične

bubrežne bolesti,²⁷⁵ pa je pretpostavljeno da je i kod njih, uprkos uspešnoj transplantaciji, takođe povećana aktivnost simpatikusa. Ova simpatička hiperaktivacija je u pozitivnoj korelaciji sa kardiovaskularnim morbiditetom u ovoj grupi pacijenata. Ukoliko se postulira da renalaza, kao regulator metabolizma kateholamina, oslikava simpatičku aktivaciju, njena identifikacija i karakterizacija bi mogle da doprinesu boljem razumevanju uloge simpatičkog delovanja nakon transplantacije. Renalaza metaboliše kateholamine, na taj način reguliše funkciju kardiovaskularnog sistema i arterijski pritisak.

U našoj studiji aktivnost renalaze u plazmi je bila značajno viša kod pacijenata sa transplantatom nego u kontroli. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ostalih istraživača, kod pacijenata nakon transplantacije bubrega²⁷⁶ ili srca.²⁷⁷ Renalaza cirkuliše u plazmi kao proenzim, čekajući adekvatan signal za aktivaciju, odnosno povišenu koncentraciju kateholamina. Eksperimentalna ispitivanja sa infuzijom kateholamina u uslovima *in vivo* dovela su do desetstrukog porasta aktivnosti renalaze unutar 30 sekundi.²⁷⁸ Sa druge strane nedostatak renalaze, kod nokaut miševa, uslovljava značajan porast dijastolnog pritiska, tahikardiju i neadekvatni odgovor α -1 receptora na povišene vrednosti plazmatskih i urinarnih kateholamina.²⁷⁹ Ovaj efekat vezan je za trostruko povećanje nivoa plazmatskog adrenalina, zbog nedostatka renalaze.²⁷⁹ Simpatička aktivacija je u korelaciji sa ekskrecijom natrijuma i aktivacijom RAA sistema, kao i volumen zavisnom hipertenzijom.²⁸⁰ U prilog značaja simpatičke aktivacije za razvoj kongestivne srčane insuficijencije nakon transplantacije ide i podatak da je incidencija *de novo* otkrivene insuficijencije 2 do 5 puta veća kod pacijenata nakon transplantacije u poređenju na incidenciju istog oboljenja u opštoj populaciji. Zbog toga transplantacija bubrega može biti faktor rizika za nastanak ubrzane insuficijencije srca-*accelerated heart failure*.²⁶⁰

Povišena sekrecija renalaze (poreklom iz grafta) u našoj ispitivanoj grupi je verovatno kompenzatorni odgovor na aktivaciju aferentnih nerava iz oštećenog bubrega, jer kod pacijenata u našoj eksperimentalnoj grupi tokom transplantacije nije radjena i nefrektomija bolesnog bubrega (inkluzioni kriterijum). Otvoreno je pitanje zbog čega povećanje renalaze, od oko 9 puta, u kliničkoj grupi u odnosu na kontrolnu, ne uspeva da restituiše pritisak na normalne vrednosti. Jedna od pretpostavki je da ovaj „paradoks“

nastaje zbog prisustva supstanci koje u plazmi mogu da blokiraju aktivaciju renalaze, tačnije transformaciju iz proenzima u enzimsku formu. Druga pretpostavka koja je mnogo verovatnija je da alokalem, iako prekostimulisan, ne uspeva da postigne takav porast renalaze koji je neophodan za postizanje zadovoljavajućih vrednosti krvnog pritiska. Nisu nađene značajne razlike u koncentraciji renalaze između normotenzivnih i hipertenzivnih pacijenata sa transplantiranim bubregom. Jedno od objašnjenja bi moglo da bude da su pacijenti sa hipertenzijom imali dobru kontrolu krvnog pritiska, odnosno adekvatnu terapiju.

S obzirom da se danas smatra da ACE inhibitori imaju najveći značaj u smanjenju simpatičke aktivnosti,²⁸¹ analizirali smo promene renalaze kod pacijenata koji su kao monoterapiju imali ACE inhibitore, zatim kod onih koji nisu dobijali ACE inhibitore i kod pacijenata koji su pored ACE inhibitota dobijali jedan ili više antihipertenziva iz drugih grupa. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji renalaze u zavisnosti od propisane antihipertenzivne terapije. U eksperimentalnim uslovima renalaza data subkutano u dozi od 0,5 mg/kg/TT je imala isti hipotenzivni učinak kao i enalapril u dozi od 5 mg/kg/TT, a značajno bolji efekat nego enalapril od 1 mg/kg, verapamil od 5 mg/kg/TT ili propranolol od 50 mg/kg.²⁸²

Ovo ukazuje na to da naši pacijenti verovatno imaju povećanu aktivnost simpatikusa, a povećana aktivnost aferentne signalizacije stimuliše sekreciju renalaze i kompenzatornog je karaktera. Ona je uglavnom vezana za graft, ali u manjoj meri i za ostala tkiva: jetru, srce, poprečnu muskulaturu, masno tkivo. Moguće je da je funkcija renalaze tkivno-specifična i da zbog toga može izostati efekat normalizacije hipertenzije. Druga mogućnost je da su povećane plazmatske koncentracije renalaze vezane za smanjenje njenog klirensa zbog disfunkcije grafta. Svakako da na održanje hipertenzije kod pacijenata sa transplantatom veliki značaj ima i volumensko opterećenje.

Na našem uzorku merena je aktivnost plazmatske renalaze, mada postoje i mišljenja da je renalaza u urinu mnogo aktivnija forma ovog enzima,²² jer urinarna i serumska renalaza nisu identični molekuli.^{19,22}

Naši rezultati su pokazali da je renalaza bila u pozitivnoj korelaciji sa lipidnim parametrima: ukupnim, LDL i nonHDL-holesterolom, dok nije postojala korelacija između renalaze i HDL-holesterola i triglicerida. Pozitivna korelacija sa lipidnim

parametrima renalazu identifikuje kao potencijalnog markera aktivacije simpatičkog nervnog sistema.

Poređenje aktivnosti renalaze sa jačinom glomerulske filtracije i serumskim koncentracijama kreatinina pokazalo je da postoji nezavisna korelacija, što je identično sa rezultatima drugih istraživača. Drugi istraživači su dokumentovali i značajnu korelaciju između renalaze i jačine glomerulske filtracije kod pacijenata sa transplantacijom srca, kao i kod pacijenata na dijalizi.²⁸³⁻²⁸⁷ Utvrđeno je da se koncentracija renalaze inverzno i progresivno povećava u odnosu na stadijum bubrežne slabosti. Pacijenti čija je jačina glomerulske filtracije bila veća od 60ml/min/1,73m² imali su najniže koncentracije renalaze u plazmi, dok oni koji su bili u IV stadijumu hronične bubrežne slabosti imali su najviše koncentracije. Bliska veza između simpatičke aktivacije, koncentracije renalaze i jačine glomerulske filtracije ukazuje da je aktivacija ovog sistema progresivnog karaktera i da igra značajnu ulogu u patogenezi bubrežne ishemije. Istovremeno ona ukazuje i na neodgovarajuću kontrolu aferentih signala od strane bolesnog bubrega.²⁸⁸ Svakako da određivanje renalaze sa velikom sigurnošću može da ukaže na stepen bubrežnog oštećenja. To je verovatno vezano za već pomenuto smanjenje klirensa i retenciju renalaze u organizmu usled razvoja bubrežne slabosti. Još uvek je otvoreno pitanje kolika je senzitivnost renalaze kao parametra bubrežne funkcije u odnosu na kreatinin.

Ovo istraživanje dokazalo je i postojanje pozitivne korelacije renalaze sa brojem leukocita, što navodi na zaključak da je inflamacija verovatno potencirana bubrežnom disfunkcijom. Nasuprot tome renalaza nije pokazala korelaciju sa vrednostima CRP-a. Još uvek nema literaturnih podataka o vezi ova dva parametra, iako je CRP dokazani marker kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta, a renalaza predložena kao potencijalni kardiovaskularni marker. C-reaktivni protein, zapravo nije pokazao korelaciju ni sa jednim ispitivanim parametrom, tako da sudeći po našim rezultatima nije pogodan za praćenje i evaluaciju ovih pacijenata.

Renalaza takođe nije pokazala korelaciju ni sa jednim markerom endotelne disfunkcije: dimetilargininima (ADMA i SDMA), nitratima, eNOS, kao ni sa adhezivnim molekulima (ICAM-1 i VCAM-1), što se razlikuje od rezultata drugih istraživača.²⁷⁶ Nesumnjivo je da su povećana simpatička aktivnost i koncentracija ADME faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih komplikacija kod pacijenata na dijalizi, ali je dokazano da su

pod rizikom i pacijenti od 2 do 4 stadijuma bubrežne slabosti.²⁸⁹ Poznato je da se renalaza u manjoj meri sekretuje od strane endotelnih ćelija i mogla bi biti povezana sa markerima endotelnog oštećenja, ali prema našim rezultatima ona je bila determinisana isključivo bubrežnom funkcijom.

Dokumentovano je da simpatička hiperaktivacija i ADMA mogu deliti iste patogenetske mehanizme oštećenja bubrega i razvoja bubrežne insuficijencije. Simpatička aktivnost je opisana kao glavni patogenetski faktor za smanjenje jačine glomerulske filtracije, dok ADMA ima najznačajniju ulogu u razvoju proteinurije.²⁸⁹ Pretpostavka je da oštećenje ciljnih organa (bubrega ili srca) značajno više zavisi od simpatičke aktivacije, nego od dejstva ADME, koji je dozno-zavistan. To ukazuje da smanjenje ekskretorne funkcije bubrega započinje neposredno pre oštećenja endotela. Ovakav patogenetski sled pokazuje da je verovatno najraniji događaj u oštećenju bubrega zapravo aktivacija simpatičkog nervnog sistema. Ove pretpostavke zahtevaju dalju evaluaciju pacijenata i egzaktnije merenje simpatičke aktivnosti u cilju njenog daljeg dokazivanja. Merenje MSNA mikroneurografijom je i vremenski i tehnički zahtevna procedura i ne može se ustaliti kao svakodnevna i rutinska praksa. Iz tog razloga je neophodno pronaći biomarker koji bi sa velikom preciznošću reflektovao stanje simpatičkog nervnog sistema kod svih grupa pacijenata sa povećanim faktorima rizika.

6.3. Prediktori procene bubrežne funkcije kod pacijenata nakon uspešne transplantacije bubrega

Zahvaljujući postupku transplantacije, odnosno ugradnji bubrega donora, dolazi do poboljšanja globalne funkcije bubrega. Međutim i sa transplantiranim bubregom stepen bubrežne funkcije ostaje na nivou trećeg ili četvrtog stadijuma hronične bubrežne slabosti. Veliki je broj studija koje su disfunkciju grafta izdvojile kao nezavisni faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih događaja. Tako pacijenti sa smanjenjem glomerulske filtracije na 20 ml/min ili manje, imaju šestostruko veći mortalitet iz različitih uzroka,²⁹⁰ kao i povećan rizik od smrti usled neželjenog kardiovaskularnog događaja.²⁹¹ Interesantan je podatak da je mortalitet od kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata na dijalizi 16,1%, kod pacijenata koji su na listi čekanja za transplantaciju 6,3%, a kod onih nakon transplantacije 3,8%.²⁹² Ipak postoji visoka incidencija kardiovaskularne bolesti

nakon transplantacije i ona se objašnjava perzistencijom klasičnih faktora rizika i u posttransplantacionom periodu i pojavom drugih, tzv. neklasičnih faktora rizika. Predloženo je da smanjena funkcija grafta bude „klasični“ faktor rizika. Rezultati epidemioloških studija ukazuju da oko 60% pacijenata nakon transplantacije ima glomerulsku filtraciju ispod 60 ml/min, a 15% ispod 30 ml/min na godišnjem nivou.^{293,294} Analiza podataka 58900 pacijenata iz USRDS (US Renal Data System) je pokazala da je serumski kreatinin, godinu dana nakon transplantacije, nezavisni faktor rizika za kardiovaskularni događaj. Sa porastom vrednosti kreatinina za više od 132,6 $\mu\text{mol/L}$ rizik progresivno raste.²⁹⁵ *ALERT* studija je takođe pokazala da je porast kardiovaskularnog, nekardiovaskularnog mortaliteta, ukupnog mortaliteta, kao i neželjenih kardiovaskularnih događaja u značajnoj korelaciji sa serumskim kreatininom (naročito višim od 200 $\mu\text{mol/l}$).²⁹⁶ Analiza 60141 pacijenata sa transplantatom iz pomenutog registra u poređenju sa 66813 pacijenata na listi čekanja za transplantaciju je pokazala da je pik umiranja od kardiovaskularne bolesti unutar prva tri meseca nakon transplantacije, a zatim lagano opada sa uspostavljanjem funkcije grafta.²⁹⁷ Pacijenti koji su u predijaliznom periodu i na listi čekanja za transplantaciju, imaju povećanu incidenciju obolevanja, koja je u pozitivnoj korelaciji sa dužinom čekanja.

Iz razloga dugoročnog preživljavanja pacijenata nakon transplantacije, neophodno je bolje razumevanje faktora koji utiču na smanjenje bubrežne funkcije, kao i identifikacija biomarkera koji bi mogli da ukažu na rano smanjenje funkcije bubrega. Zbog toga smo analizirali ispitivane parametre sa ciljem da u univarijantnom modelu, nakon prilagođavanja za godine i u multivarijantnom modelu, utvrdimo potencijalne prediktore za smanjenje jačine glomerulske filtracije. Na našem uzorku kao prediktori za smanjenje jačine glomerulske filtracije izdvojili su se: ukupni holesterol, LDL-holesterol, non-HDL holesterol, VCAM-1 i renalaza. S druge strane povećana koncentracija eNOS-a pokazala je značajan protektivni efekat na jačinu glomerulske filtracije. Ostali evaluirani parametri, kao što su koncentracija triglicerida, HDL-holesterol, dimetilarginini i nitrati nisu imali nikakav uticaj na bubrežnu funkciju.

Analizirajući koncentracije VCAM-1, kao markera hronične inflamacije, zaključili smo da su se povećane koncentracije ovog adhezionog molekula izdvojile kao nezavisan prediktor za smanjenje jačine glomerulske filtracije. VCAM-1 molekuli su

pokazali i prediktivni karakter i nakon prilagođavanja za godine i u multivarijantnom modelu. Ateroskleroza krvnih sudova bubrega je proces koji ima značajan uticaj na bubrežnu funkciju. U prilog tome je i podatak da je koncentracija VCAM-1 molekula predložena kao marker ranih ateromatoznih promena kod pacijenata koji su kandidati za transplantaciju bubrega.²⁰⁸ Visoke koncentracije ICAM-1 adhezionih molekula su takođe detektovane kod pacijenata u predijaliznom periodu,^{291,292} kao i kod pacijenata u završnoj fazi hronične bubrežne bolesti.²⁹³ Na našem uzorku, ICAM-1 adhezioni molekuli, iako viših vrednosti u odnosu na kontrolu, nisu se izdvojili kao prediktori bubrežne disfunkcije, ni kao nezavisni, niti nakon prilagođavanja.

Na animalnom modelu hronične bubrežne slabosti dokazana je uzročna veza između dislipidemije i glomeruskog oštećenja sa razvojem glomeruloskleroze.^{298,299} Na osnovu toga je postavljena hipoteza da dislipidemija može biti jedan od glavnih faktora koji dovodi ne samo do progresije bubrežne insuficijencije, već ima i značajno učešće u samom nastanku oštećenja bubrega.¹⁸ U velikoj prospektivnoj studiji pacijenata sa primarnom bolešću bubrega, povećane koncentracije LDL-holesterola, ali ne i smanjene koncentracije HDL-holesterola, su pozitivno korelirale sa bržom progresijom bubrežne insuficijencije, čak i nakon smanjenja proteinurije.³⁰⁰ Takođe, u velikoj studiji prospektivnog karaktera u kojoj je praćena populacija „zdravih“ muškaraca i uticaj dislipidemije na bubrežnu funkciju,¹⁸ dokazano je da su povišene vrednosti ukupnog holesterola, nonHDL-holesterola, visok odnos ukupnog holesterola/HDL i niske vrednosti HDL-holesterola značajni prediktori smanjenja jačine glomerulske filtracije kroz duži vremenski period. U našoj grupi pacijenata nakon transplantacije smo opservirali slične lipidne parametre i dokazali da se visoke vrednosti totalnog, LDL i non-HDL holesterola izdavaju kao snažni i nezavisni prediktori smanjenja jačine glomerulske filtracije ispod 60 ml/min. Korišćenjem logističke regresije ovi lipidni parametri su se izdvojili i kao značajni prediktori i nakon prilagođavanja za godine i prilagođavanja za prisustvo komorbiditeta: dijabetesa i hipertenzije, kao i štetnih životnih navika (pušenje i visoki indeks mase tela).

Povišena koncentracija renalaze se u logističkoj regresiji izdvojila kao značajni prediktor za smanjenje jačine glomerulske filtracije, kao nezavisan prediktor, ali i nakon prilagođavanja za godine, komorbiditete, indeks telesne mase i pušenje.

Renalaza je predložena kao marker za AKI (*acute kidney injury*),³⁰¹ kao rani marker ishemije bubrega, a u nekim slučajevima je dokumentovano da je osjetljivija od kreatinina nakon subkliničkog oštećenja bubrega i inicijalnog smanjenja bubrežne funkcije. Na osnovu naših rezultata mogli bismo da je predložimo kao rani marker bubrežne insuficijencije u posttransplantacionom praćenju pacijenata.

Bubrežna funkcija je prema nekim autorima nazvana „Pepeljugom kardiovaskularne bolesti“, a smanjena jačina glomerulske filtracije „predvorjem“ endotelne disfunkcije i inflamacije. Iz tog razloga je od krucijalne važnosti blagovremeno otkrivanje inicijalne bubrežne disfunkcije i/ili pogoršanja već postojeće i rana identifikacija pacijenata koji su pod većim rizikom za razvoj kardiovaskularnih komplikacija. Upoređivanjem prediktivnih vrednosti svih evaluiranih parametara zaključuje se da je renalaza parametar sa najvišim korelacionim koeficijentom, te da njene koncentracije u plazmi, bolje od ostalih parametara, ukazuju na razvoj bubrežne disfunkcije. Ostaje, ipak, da se utvrdi koji od pomenutih parametara pokazuje najveću senzitivnost i specifičnost u odnosu na ranu bubrežnu disfunkciju.

6.4. Uticaj imunosupresivne terapije na parametre endotelne disfunkcije

Takrolimus i ciklosporin su, danas, najznačajniji i najkorišćeniji imunosupresivi, sa ciljem prevencije epizoda akutnog i hroničnog odbacivanja kalema. Iako je preživljavanje grafta u prvoj posttransplantacionoj godini u značajnom porastu, ipak se beleži trend odbacivanja grafta, od oko 3-5%, na godišnjem nivou.³⁰² U najvećem broju slučajeva ovo kasno odbacivanje nastaje usled razvoja hronične nefropatije grafta ili smrtnog ishoda iz nekog drugog razloga, uz adekvatnu funkciju grafta.³⁰³ Brojni imunološki i neimunološki faktori učestvuju u patogenezi ove nefropatije i imaju negativan uticaj na preživljavanje ovih pacijenata.³⁰³ Imunološki faktori se uglavnom odnose na HLA neslaganje i subdoziranje imunosupresivne terapije, a neimunološki faktori uključuju godine donora, ishemijsko-reperfuziono oštećenje bubrega, odloženu funkciju grafta, hiperlipidemiju, hipertenziju, toksične efekte imunosupresivne terapije, kao i razvoj određenih infekcija. Većina ovih pacijenata pre transplantacije ima značajne faktore rizika za kardiovaskularnu bolest, a transplantacija ih ne eliminiše u potpunosti. Faktori rizika kao što su hipertenzija, hiperlipidemija, odnosno dislipidemija i razvoj

šećerne bolesti mogu biti pogoršani upotrebom imunosupresivne terapije.^{304,305} Osim što su tradicionalni faktori rizika za razvoj kardiovaskularnih komplikacija, hipertenzija i hiperlipidemija, imaju značajan udeo i u patogenezi hronične nefropatije grafta,³⁰⁶ a značajan udeo ima i sama imunosupresivna terapija.

Dve velike, randomizovane, multicentrične studije sprovedene u Evropi i Sjedinjenim Državama su pokazale da je incidencija akutnog odbacivanja kalema značajno manja kod 508 pacijenata koji su kao glavni kalcineurinski inhibitor koristili takrolimus, u poređenju sa 355 pacijenata koji su koristili ciklosporin.^{307,308} Preživljavanje grafta je bilo duže, a incidencija hroničnog odbacivanja kalema značajno manja kod pacijenata koji su koristili takrolimus tokom petogodišnje studije praćenja.³⁰⁷ Osim toga, bubrežna funkcija kod pacijenata na takrolimusu, pet godina nakon transplantacije, bila je značajno bolja nego kod pacijenata na ciklosporinu, za isti vremenski period.³⁰⁸ Podaci dobijeni nakog šestomesečnog i dvaneastomesečnog praćenja pokazali su dvostruko smanjenje broja pozitivnih biopsija bubrega ili steroid-zavisnog akutnog odbacivanja kalema kod pacijenata na takrolimusu u odnosu na pacijente na ciklosporinu.^{309,310} Nekoliko studija je dokazalo da rekurentne epizode akutnog odbacivanja, kao i epizode kasnog odbacivanja grafta, imaju značajan uticaj na razvoj hronične nefropatije grafta.^{311,312,313} U prilog tome idu i rezultati dve velike, kontrolisane, randomizovane studije koje su pokazale da je incidencija intersticijske fibroze manja kod ovih pacijenata.^{314,315} U grupi zdravih ispitanika-dobrovoljaca primena ciklosporina dovela je do značajnog smanjenja jačine glomerulske filtracije i bubrežnog protoka, kao i do porasta ukupnog renalnog vaskularnog otpora,. Ovi efekti nisu zabeleženi kod ispitanika koji su koristili takrolimus.³¹⁵ Kod pacijenata sa transplantiranim bubregom na takrolimusu, dokazan je manji vaskularni otpor na nivou bubrega i potreba za manjom dozom antihipertenzivne terapije u poređenju sa pacijentima na ciklosporinu.³¹⁶ Rezultati *Cardiff Tacrolimus vs Cyclosporin Kidney Transplant* studije sa 232 pacijenata su pokazali značajno bolju funkciju grafta kod pacijenata na takrolimusu, uz istovremeno šestogodišnje preživljavanje grafta.³¹⁷ Nekoliko studija je dokazalo da kod ispitanika sa takrolimusom u poređenju sa ciklosporinom postoje niže koncentracije ukupnog holesterola i niže vrednosti krvnog pritiska.^{318,319,320,321} U zaključku ovih studija ukazano je da pacijenti na terapiji sa

takrolimusom imaju značajno smanjen rizik za razvoj neželjenih kardiovaskularnih događaja.^{322,323}

Poslednja veća multicentrična studija iz 2005. godine takođe je potvrdila duže preživljavanje pacijenata koji su koristili takrolimus, ukazujući na to da je ovaj imunosupresiv podjednako efikasan i kao monoterapija. Rezultati ove studije pokazali su da su vrednosti serumskog kreatinina u dvogodišnjem praćenju bile značajno niže u grupi pacijenata na takrolimusu.³²⁴ Studija na 40963 ispitanika je pokazala da dve godine nakon transplantacije pacijenti imaju sporiji pad jačine glomerulske filtracije ukoliko koriste takrolimus u odnosu na ciklosporin,³²⁵ a *Cardiff* studija³¹⁷ je dokazala da su pacijenti na takrolimusu imali značajno niže serumske koncentracije holesterola i triglicerida, kao i manju potrebu za antilipemičnom terapijom. Generalni zaključak pomenute studije je bio da takrolimus obezbeđuje bolji kardiovaskularni profil. Osim toga, navodi se i da je takrolimus, zahvaljujući svojoj efikasnosti, moguće propisati kao monoterapiju ili je, uz terapiju takrolimusom, moguća redukcija doze kortikosteroida, sa značajnom modifikacijom kardiovaskularnih faktora rizika.³²² U skladu sa ovim zaključcima, podaci o 11659 prvih recipijenata grafta iz USRDS registra, ukazuju da takrolimus, iako dovodi do razvoja posttransplantacione šećerne bolesti, omogućava bolje i duže preživljavanje grafta, kao i manji razvoj komplikacija.³²⁶

U prilog svemu navedenom je i činjenica da pacijenti sa stabilnom funkcijom grafta koji su tretirani ciklosporinom, a elektivno prevedeni na terapiju takrolimusom, imali bolje šestogodišnje preživljavanje, kao i manje vrednosti krvnog pritiska i koncentracije LDL-holesterola. Redukcijom ovih faktora rizika kod njih je istovremeno smanjena incidencija za razvoj hronične nefropatije grafta. Dokazan je i *vice versa* efekat, prevodjenjem sa takrolimusa na ciklosporinski protokol.

Uvođenjem ciklosporina nakon transplantacije krvni pritisak raste za oko 40-70%, s tim što je značajniji porast sistolnog krvnog pritiska.³²⁷ Osim nefrotoksičnosti i retencije natrijuma, porast sistemskog vaskularnog otpora i narušeni vazodilatatorni mehanizmi takođe imaju ulogu u patogenezi ciklosporinom izazvane hipertenzije.³²⁸⁻³³⁰ Plazma reninska aktivnost je najčešće normalna ili čak snižena, što ide u prilog tvrdnji da je volumen cirkulišuće tečnosti povećan.³³¹ U animalnim modelima simpatička aktivnost tokom terapije ciklosporinom je najčešće konstantno povećana.³³²⁻³³⁴ Ukoliko renalazu

posmatramo kao potencijalni parametar simpatičke aktivacije, ovo je u skladu sa našim rezultatima, gde je plazmatska koncentracija renalaze značajno viša u grupi pacijenata koji su koristili ciklosporin. Na osnovu toga bismo mogli da zaključimo da je, i na našem modelu, aktivacija simpatičkog nervnog sistema izraženija kod pacijenata koji su na terapiji ciklosporinom. Jačina glomerulske filtracije bila je manja kod pacijenata tretiranih ciklosporinom, ali bez statističke značajnosti. Simpatička hiperaktivacija je osim kod pacijenata sa transplantiranim bubregom, koji su u okviru svog imunosupresivnog protokola primali ciklosporin, dokazana i kod pacijenata nakon transplantacije srca, kao i kod pacijenata sa mijastenijom gravis, takođe na ciklosporinu.³²⁸

Vazodilatacija je takođe kompromitovana kod pacijenata sa ciklosporinskom terapijom, što govori u prilog povećane aktivacije simpatičkog nervnog sistema.³²⁹ Administracija L-arginina (na animalnom modelu) deluje protektivno, jer je dokazano da je vazodilatacija, zavisna od delovanja NO, inhibisana upotrebom ciklosporina.³³⁵ Kod ovih pacijenata urinarna ekskrecija endotelina je bila povećana.³³⁶ Oba imunosupresiva dovode do smanjene aktivnosti azot monoksida i endotelne disfunkcije. Takrolimus može da dovede do blokade aktivnosti transkripcije eNOS-a i tako smanji sintezu NO. Kada je u pitanju ciklosporin smanjena produkcija NO nastaje prevashodno zbog njegovog kalciuričnog efekta.

Ciklosporin, dakle povećanjem perifernog otpora učestvuje u patogenezi hipertenzije, ali se još uvek ne zna da li u toj hipertenziji dominiraju hormonalni, neurogeni ili endotelni faktori.

Umeren porast krvnog pritiska kod pacijenata na takrolimusu može se objasniti manjim porastom volumena ekstracelularne tečnosti i manjim promena u sistemskom perifernom otporu. Još uvek nema mnogo podataka o uticaju takrolimusa na proces vazokonstrikcije, ali u kulturi tubulskih ćelija, nakon tretiranja takrolimusom, dokazana je ekspresija endotelina.³³⁷ Nasuprot ciklosporinu, takrolimus ne dovodi do inhibicije azot monoksid sintaze u kulturi glatkomišićnih ćelija aorte pacova.³³⁸ Simpatička hiperaktivnost na nivou bubrega pacova je eksperimentalno dokazana i tokom terapije i ciklosporinom i takrolimusom,³³³ mada vazokonstriktorni efekat takrolimusa kod ljudi još uvek nije u potpunosti dokazan. Smatra se da takrolimus ima različit efekat kad je u

pitanju bubrežna, odnosno periferna hemodinamika. Ima i mišljenja da je vazokonstriktorni efekat na nivou bubrega identičan ciklosporinu.³³⁹ Dokazano je i da terapija ciklosporinom onemogućava fiziološko smanjenje krvnog pritiska tokom noći,³⁴⁰ i ono je manje od 10 mmHg. Tokom iste studije pri terapiji takrolimusom nisu postojale velike varijacije u dnevno-noćnim vrednostima krvnog pritiska i tokom 24-časovnog monitoringa krvni pritisak je bio nižih vrednosti. To ukazuje da bi za procenu oštećenja organa bio neophodan 24-časovni monitoring krvnog pritiska.³⁴¹ Kod naših pacijenata nije praćen krvni pritisak tokom 24 sata, već samo njegove vrednosti u jutranjim satima. One se nisu razlikovale u odnosu na primenjenu terapiju i njihovog adekvatnog odgovora na antihipertenzivnu terapiju.

Hiperlipidemija je značajna ne samo kao tradicionalni faktor rizika za razvoj kardiovaskularne bolesti, nego i kao faktor rizika za razvoj hronične nefropatije kalema. Hiperlipidemija indukovana imunosupresivima uglavnom se odnosi na porast LDL frakcije i nastaje usled redukovano katabolizma LDL-holesterola u hepatocitima.³⁴² Nekoliko studija je dokazalo da je ovo predominantno efekat ciklosporina, te da takrolimus značajno manje menja lipidni profil pacijenata. Međutim ovi rezultati ne koreliraju sa rezultatima naše studije, jer su pacijenti, bez obzira na primenjeni vid imunosupresivne terapije imali sličan lipidni profil sa hiperholesterolemijom i hipertrigliceridemijom. Ostali parametri endotelne disfunkcije, adhezioni molekuli, kao i parametri nitrozativnog stresa, takođe, nisu pokazali značajnost u odnosu na vid primenjene imunosupresije. Naši rezultati ukazuju na identičan stepen endotelnog oštećenja kod obe grupe pacijenata. Na osnovu toga ne bi se mogao dati primat jednom u odnosu na drugi tip imunosupresiva.

Bilo bi od važnosti pomenuti da naši pacijenti u terapiji imaju i kortikosteroide kao deo obavezne imunosupresije. S obzirom na različitost doza primenjenih kortikosteroida nije moguće razgraničiti koliki je udeo kortikosteroida u patogenezi hipertenzije i lipidnih poremećaja, a koliki efekat pripada kalcineurinskim inhibitorima. Poteškoće pri tumačenju rezultata predstavlja i činjenica da neki od pacijenata povremeno koriste antilipemičnu terapiju, što utiče na promenu njihovog lipidnog statusa u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol.

7.0. Zaključak

1. Svi ispitivani parametri koji ukazuju na postojanje endotelne disfunkcije bili su značajno viši u kliničkoj u odnosu na kontrolnu grupu.
2. Parametri hronične inflamacije, adhezioni molekuli (ICAM-1 i VCAM-1), su takođe bili viših koncentracija kod pacijenata nakon transplantacije u odnosu na zdrave pojedince, dok se koncentracije C-reaktivnog proteina nisu razlikovale među grupama.
3. Svi parametri nitrozativnog stresa (nitrati, nitriti, derivati arginina: ADMA i SDMA i eNOS) su bili viših koncentracija kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na kontrolu.
4. Koncentracija renalaze u plazmi je, takođe, bila značajno viša u odnosu na kontrolu.
5. Najveći broj pacijenata nakon transplantacije bubrega bio je u III i IV stadijumu hronične bubrežne slabosti.
6. Postojala je značajna i inverzna korelacija renalaze sa jačinom glomerulske filtracije i pozitivna korelacija sa vrednostima serumskog kreatinina.
7. Renalaza je takođe bila u pozitivnoj korelaciji sa parametrima lipidnog statusa (ukupnim, LDL i nonHDL holesterolom), ali nije bilo značajnosti u odnosu na ispitivane parametre nitrozativnog stresa (nitrate, nitrite, eNOS-a i dimetilarginine ADMA i SDMA).
8. Koncentracija renalaze zavisila je od stadijuma bubrežne slabosti, najviša je bila kod pacijenata u petom stadijumu bubrežne slabosti, a najniža kod pacijenata sa očuvanom globalnom funkcijom bubrega.
9. Kao nezavisni prediktori za smanjenje jačine glomerulske filtracije, ispod 60 ml/min/1,73m² izdvojile su se vrednosti ukupnog holesterola viših od 5,2 mmol/l, LDL holesterola viših od 4,1 mmol/l i nonHDL holesterola viših od 4,2 mmol/l.
10. Prediktori za smanjenje bubrežne funkcije ispod 60 ml/min/1,73m² u odnosu na starost ispitanika, bili su ukupan holesterol viši od 5,2 mmol/l, LDL holesterol viši od 4,1 mmol/l i nonHDL holesterol viši od 4,2 mmol/l.

11. Nakon prilagođavanja za komorbiditete (arterijsku hipertenziju i prisustvo šećerne bolesti), kao i štetne navike (pušenje i gojaznost) i dalje su se izdvajali identični faktori rizika.
12. Povišene koncentracije ostalih ispitivanih lipidnih parametara, triglicerida i HDL-holesterola, nisu imale značaj kao prediktori za smanjenje jačine glomerulske filtracije ispod 60 ml/min/1,73m².
13. Visoka koncentracija adhezionih molekula VCAM-1 dokazana je kao nezavisni faktor rizika za smanjenje bubrežne funkcije, kao faktor rizika nakon prilagođavanja za starost ispitanika, a takođe i u multivarijanom modelu
14. Visoka koncentracija adhezionih molekula, ICAM-1, nije pokazala prediktivni značaj za smanjenje bubrežne funkcije, niti je bila prediktor u skladu sa godinama ili nakon prilagođavanja za komorbiditete ili štetne navike..
15. Visoka plazmatska koncentracija renalaze je takođe pokazala značajnost kao nezavisni faktor rizika, kao faktor rizika u odnosu na godine ispitanika i nakon prilagođavanja za komorbiditete ispitanika, za smanjenje jačine glomerulske filtracije ispod 60 ml/min/1,73m².
16. Uremijski toksini, ADMA i SDMA, kao i koncentracije nitrata i nitrita, nisu pokazali prediktivni značaj za smanjenje bubrežne funkcije, ni u nezavisnom niti u multivarijantnom modelu. Koncentracija SDMA, je ipak, pokazala značajnu pozitivnu korelaciju sa vrednostima serumskog kreatinina.
17. Endotelna azot monoksid sintaza, u svim metodama statističke obrade, je pokazala značaj za poboljšanje jačine glomerulske filtracije.
18. Između svih evaluiranih parametara nitrozativnog stresa (ADMA, SDMA, eNOS, i nitrata/nitrita) dokazana je pozitivna korelacija.
19. Poređenjem korelacionih koeficijenata najbolji nezavisni prediktori za smanjenje jačine glomerulske filtracije bile su vrednosti ukupnog i nonHDL holesterola.
20. Najbolji prediktivni značaj, nakon prilagođavanja za godine starosti, pokazali su ukupni holesterol, nonHDL holesterol i renalaza.
21. Nakon prilagođavanja za faktore rizika i štetne navike najbolju prediktivnu vrednost pokazali su koncentracije ukupnog i nonHDL holesterola, renalaza i koncentracije VCAM-1 molekula.

22. Nije bilo značajnih razlika u kliničko-demografskim karakteristikama, koncentracijama ispitivanih lipidnih parametara, koncentracijama parametara inflamacije i nitrozativnog stresa u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol (ciklosporin vs takrolimus).
23. Kod pacijenata, koji su kao osnov imunosupresivne terapije primali ciklosporin, postojale su značajno više serumske vrednosti kreatinina i ureje, kao i koncentracija renalaze.

8.0. Literatura

1. Inagami T, Naruse M, Hoover. Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:171-89.
2. Wolinsky H. A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ Res.* 1980;47(3):301-11.
3. Vita JA, Keaney JF. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation.* 2002;106:640-642.
4. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation.* 2007;115:1285-1295.
5. Schechter AN, Gladwin MT. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med.* 2003;348:1483-1485.
6. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;3:374-380.
7. Halcox JP, Narayanan S, Cramer-Joyce L, Mincemoyer R, Quyyumi AA. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:2470-2477.
8. Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet.* 1977;1:18-20.
9. Saye JA, Singer HA, Peach MJ. Role of endothelium in conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertension* 1984;6:216-221.
10. Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, Beltrame J, Fang JC, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 2001;104:1114-1118.
11. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006;113:1708-1714.
12. Nitsch DD, Ghilardi N, Muhl H, Nitsch C, Brune B, Pfeilschifter J. Apoptosis and expression of inducible nitric oxide synthase are mutually exclusive in renal mesangial cell. *Am. J. Pathol.* 1997;150:889-900.
13. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280:193-206.
14. Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation.* 2006;113:1708-1714.
15. Numaguchi K, Egashira K, Takemoto M, Kadokami T, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. *Hypertension.* 1995;26(1):957-962.
16. Le Tourneau T, Van Belle E, Corseaux D, Vallet B, Lebuffe G, Dupuis B, Lablanche JM, McFadden E, Bauters C, Bertrand ME. Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: effects on neointimal hyperplasia and vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:876-882.

17. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002;109 Suppl:81-96.
18. Tojo A, Welch WJ, Bremen, et al. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int*. 1997; 52:1593-1601.
19. Holmqvist B, Olsson CF, Svensson, ML, Svanborg C, Forsell J, Alm P. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the mouse kidney: Cellular localization and influence by lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4. *J. Mol. Histol*. 2005;36:499-516.
20. Morrisey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Klahr S. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int*. 1994; 45:998-1005.
21. Raij L, Shultz PJ. Endothelium-Derived relaxing factor, nitric oxide: Effects on and production by mesangial cells and glomerulus. *J. Am. Soc. Nephrol*. 1993;3: 1435-1441.
22. Echevarría LA, Fernando Andrade F. Asymmetric Dimethylarginine, Endothelial Dysfunction and Renal Disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2012;13:11288-11311.
23. Kleinbongard P, et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 35(7):790-796.
24. Lauer T, et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *PNAS*. 2001; 98(22):12814-12819.
25. Loscalzo, J. L-Arginine and atherothrombosis. *J. Nutr*. 2004;134:2798-2800.
26. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.
27. Rhee SG. Cell signaling: H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006;312:1882-1883.
28. Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:1728-1730.
29. Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, Chakrabarti A, Richardson BC, Sheldon E, McCune WJ, Kaplan MJ. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood*. 2004;103:3677-3683.
30. Op den Buijs J, Musters M, Verrips T, Post JA, Braam B, Van Riel N. Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing and telomere shortening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:2651-2658.
31. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
32. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9:1370-1376.
33. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Mische E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits

- neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004;20:109:220-226.
34. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2001;103:2885-2890.
 35. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*.2002;105:3017-3024.
 36. Loomans CJ, Wan H, de Crom R, van Haperen R, de Boer HC, Leenen PJ, Drexhage HA, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ, Staal FJ. Angiogenic murine endothelial progenitor cells are derived from a myeloid bone marrow fraction and can be identified by endothelial NO synthase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1760-1767.
 37. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Inflammation and Atherosclerosis in End-Stage Renal Disease. *Blood Purif* 2003;21:29-36.
 38. Kasiske BL. Risk factor for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med* 1988;84:985.
 39. Joles JA, Vos IH, Grone HJ et al. Inducible nitric oxide synthase in renal transplantation. *Kidney Int* 2002;61:872-875.
 40. Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005;10:11-17
 41. Caló LA, Dall'Amico R, Pagnin E, Bertipaglia L, Zacchello G, Davis PA. Oxidative stress and post-transplant hypertension in pediatric kidney-transplanted patients. *J. Pediatr*. 2006;149:53-57.
 42. Morris ST, McMurray JJV, Rodger RS, Farmer, R. Jardine, A.G. Endothelial dysfunction in renal transplant recipients maintained on cyclosporine. *Kidney Int*. 2000; 57:1100-1106.
 43. Zakrzewicz D, Zakrzewicz A, Wilker S, Boedeker RH, Padberg W, Eickelberg O, Grau V. Dimethylarginine metabolism during acute and chronic rejection of rat renal allografts. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:124-135.
 44. Wilcken DE, Sim AS, Wang J et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. *Mol Genet Metab* 2007;91:309-317.
 45. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am J Physiol Ren Physiol* 2008;294:1-9.
 46. Boger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003;4:23-28.
 47. Boger RH, Cooke JP, Vallance P. ADMA: an emerging cardiovascular risk factor. *Vasc Med* 2005;10:1-2.
 48. Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS et al. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2287-2295.
 49. Fliser D. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): the silent transition from an 'uraemic toxin' to a global cardiovascular risk molecule. *Eur J Clin Invest* 2005; 35:71-79.

50. Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovascular Research* 2003;59:824-833.
51. Raptis V, Kapulas S, Grekas D. Role of asymmetrical dimethylarginine in the progression of renal disease. *Nephrology* 2013;18:11-21.
52. Albrecht EW, van Goor H, Tiebosch AT et al. Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection. *Transplantation* 2000;70:1610-1616.
53. Akizuki E, Akaike T, Okamoto S et al. Role of nitric oxide and superoxide in acute cardiac allograft rejection in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;225:151-159.
54. Joles JA, Vos IH, Grone HJ et al. Inducible nitric oxide synthase in renal transplantation. *Kidney Int* 2002;61:872-875.
55. Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005;10:11-17
56. Tanaka M, Sydow K, Gunawan F et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. *Circulation* 2005;112:1549-1556.
57. Potena L, Fearon WF, Sydow K et al. Asymmetric dimethylarginine and cardiac allograft vasculopathy progression: modulation by sirolimus. *Transplantation* 2008; 85:827-833.
58. Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C et al. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int* 2005;68:1-13.
59. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:1023-30.
60. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction: Its role in hypercholesterolaemia. *Circulation* 1998;98:1842-7.
61. Clarke S. Protein methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993;5:977-83.
62. McBride AE, Silver PA. State of the Arg: Protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001;106:5-8.
63. Landim MBP, Filho AC, Chagas ACP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: Implications for atherogenesis. *Clinics* 2009;64(5): 471-8.
64. Osnai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension* 2003;42:985-90.
65. Böger RH, Sydow K, Borlak J et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: Involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ. Res.* 2000;87:99-105.
66. Baylis C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2006;2(4):209-20.
67. Devés R, Boyd CAR. Transporters for cationic amino acids in animal cells: Discovery, structure, and function. *Physiol. Rev.* 1998;78:487-545.
68. Casellas P, Jeanteur P. Protein methylation in animal cells. I. Purification and properties of Sadenosyl-L-methionine: Protein (arginine) N-methyltransferase from Krebs II ascites cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1978;519:243-54.

69. Casellas P, Jeanteur P. Protein methylation in animal cells. II. Inhibition of S-adenosyl-L-methionine: Protein (arginine) N-methyltransferase by analogs of S-adenosyl-L-homocysteine. *Biochim. Biophys. Acta* 1978;519:255-68.
70. Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 1999;43:542-8.
71. Closs E, Basha FZ, Habermeier A, Forstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺-carrier hCAT-2B. *Nitric. Oxide* 1997;1:65-73.
72. Brunini T, Moss M, Siqueira M et al. Inhibition of l-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and Nmonomethyl- l-arginine: Effects of arterial hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004; 31: 738–40.
73. Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Postel SC, Täger M, Bode-Böger SM. Erythropoietin increases asymmetric dimethylarginine in endothelial cells: Role of Dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16:892-8.
74. Ueno S, Sano A, Kotani K, Kondoh K, Kakimoto Y. Distribution of free methylarginines in rat tissues and in the bovine brain. *J. Neurochem.* 1992;59: 2012-16.
75. Vallance P, Leone A, Calver A et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572–6.
76. MacAllister R, Whitley G, Vallance P. Effect of guanidine and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int.* 1994;45:737–42.
77. Osamu S, Masato T, Tsuyoshi M et al. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. Involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:1682-8.
78. Olken NM, Marletta MA. NG-methyl-L-arginine functions as an alternative substance and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry* 1993;32:9677-85.
79. Pou S, Keaton L, Surichamom W, Rosen GM. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 9573-80.
80. Wang D, Gill SP, Chabrashvili T et al. Isoform-specific regulation by NG,NG-Dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. *Circ. Res.* 2007;101(6):627-35.
81. Matsumoto M, Mori A. Effects of guanidino compounds on rabbit brain microsomal Na⁺-K⁺ ATPase activity. *J. Neurochem.* 1976;27:635-6.
82. Kajimoto H, Kai H, Aoki H et al. Inhibition of eNOS phosphorylation mediates endothelial dysfunction in renal failure: New effect of asymmetric dimethylarginine. *Kidney Int.* 2012;81(8):762-8.
83. Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P. Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: A mechanism for differential inhibitor of NO synthases? *Am. J. Physiol.* 1995;269:750-56.
84. Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J. Chromatogr. B. Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;851 (1-2):21-9.

85. Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E et al. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004;42(12):1377-83.
86. Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev. Med. Chem.* 2004;4:823-32.
87. Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K. Metabolism of NG NG-dimethylarginine and NG NGdimethylarginine in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987;252:526-37.
88. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: Further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99:13527-32.
89. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat. Struct. Biol.* 2001;8:679-83.
90. Tran CTL, Fox MF, Vallance P, Leiper J. Chromosomal localization, gene structure and expression pattern of DDAH1: Comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000;68:101-5.
91. Akbar F, Heinonen S, Pirskanen M, Uimari P, Tuomainen TP, Salonen JT. Haplotypic association of DDAH1 with susceptibility to pre-eclampsia. *Mol. Hum. Reprod.* 2005;11:73-7.
92. Böger RH, Zoccali C. ADMA: A novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 2003;4:(Suppl 4):23-8.
93. Fleck C, Janz A, Schweitzer F, Karge E, Schwertfeger M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int. Suppl.* 2001;78:14-8.
94. Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Van Guldener C, Stehouwer CD, Rauwerda JA, Teerlink T. Net renal extraction of asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SDMA) dimethylarginine in fasting humans. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002; 17:1999-2002.
95. Achan V, Broadhead M, Malaki M et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23:1455-9.
96. Pope AJ, Karuppiyah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol. Res.* 2009;60 (6):461-5.
97. Hu X, Atzler D, Xu X et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(7):1540-46.
98. Schwedhelm E, Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 2011;7(5):275-8.
99. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: A final common pathway to end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;17:17-25.

100. Fine LG, Orphanides C, Norman JT. Progressive renal disease: The chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int. Suppl.* 1998;65:74-8.
101. Kielstein JT, Zoccali C. A new perspective for the treatment of renal diseases? *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007;18(5):1365-7.
102. Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, De Nucci G, Zatz R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension* 1996; 27 (5):1165-72.
103. Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT et al. Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: The mild to moderate kidney disease study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005;16:2456-61.
104. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: A competing risks modeling approach. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005;16:2449-55.
105. Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Teerlink T, Parving HH, Rossing P. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2008;31(4):747-52.
106. Abedini S, Meinitzer A, Holme I et al. Asymmetrical dimethylarginine is associated with renal and cardiovascular outcomes and all-cause mortality in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2010;77:44-50.
107. Ignjatović A, Cvetković T, Pavlović R, et al. *Int Urol Nephrol* 2013;45(6):1715-24.
108. Cvetkovic T, Stefanovic N, Velickovic - Radovanovic R, et al. Gender differences in oxidative and nitrosative stress parameters in kidney transplant patients on tacrolimus based immunosuppression. *Int Urol Nephrol* 2014; DOI 10.1007/s11255-013-0577-x
109. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger S.M, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function—A meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transpl.* 2006;21:2446-2451.
110. Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: A novel marker of risk and a potential target for therapy in chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2008;17:609-615.
111. Kiechl S, Lee T, Santer P, et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis* 2009;205:261-265.
112. Oner-Iyidogan Y, Oner P, Kocak H, et al. Dimethylarginines and inflammation markers in patients with chronic kidney disease undergoing dialysis. *Clin. Exp. Med.* 2009;9:235-241.
113. Schepers E, Barreto DV, Liabeuf S, et al. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Symmetric dimethylarginine as a proinflammatory agent in chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011;6:2374-2383.
114. Brooks ER, Langman CB, Wang S, et al. Methylated arginine derivatives in children and adolescents with chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 2009; 24:129-134.

115. Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, et al. Symmetrical dimethylarginine: A new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;17:1128-1134.
116. Schepers E, Glorieux G, Dou L, et al. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Guanidino compounds as cause of cardiovascular damage in chronic kidney disease: An in vitro evaluation. *Blood Purif.* 2010;30:277-287.
117. Kielstein J, Veldink H, Martens-Lobenhoffer J, et al. SDMA is an early marker of change in GFR after living-related kidney donation. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:324-328.
118. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 2002;90(suppl):40-48.
119. Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:860-866.
120. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002;109 Suppl:81-96.
121. Li X, Massa PE, Hanidu A, et al. IKK α , IKK β , and NEMO/IKK γ are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem.* 2002;277:45129-45140.
122. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, Ruiz P, Smithies O, Coffman TM. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest.* 1999;104:1693-1701.
123. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, et al. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells: new concepts. *Hypertension.* 1997;29:366-373.
124. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, et al. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1623-1629.
125. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation.* 1999;100:1223-1229.
126. Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, et al. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med.* 2002;195:245-257.
127. Komai-Koma M, Gracie JA, Wei XQ, et al. Chemoattraction of human T cells by IL-18. *J Immunol.* 2003;170:1084-1090.
128. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-1143.
129. Cominacini L, Rigoni A, Fratta Pasini A, et al. The binding of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells reduces the intracellular concentration of nitric oxide through an increased production of superoxide. *J Biol Chem.* 2001;276:13750-13755.
130. Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* 2002;106:913-919.

131. Collins T, Cybulsky MI. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest.* 2001;107:255-264.
132. Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* 2002;95: 89-100.
133. Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation.* 2002;105:1890-1896.
134. Kaplanski G, Martin V, Fabrigoule M, et al. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood.* 1998;92:1259-1267.
135. Schonbeck U, Lippy P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res.* 2001;89:1092-1103.
136. Boring L, Gosling J, Cleary M, et al. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-897.
137. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem.* 2002;277:49982-49988.
138. Yoshida H, Kondratenko N, Green S, et al. Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J.* 1998;334:9-13.
139. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* 2002;91:281-291.
140. Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-314.
141. Komatsu S, Panes J, Russell JM et al: Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension*, 1997; 29(2):683-89.
142. Markovic S, Raab M, Daxecker H et al: In vitro effects of cyclosporin A on the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. *Clin Chim Acta*, 2002;316(1-2):25-31.
143. Dedrick RL, Bodary S, Garovoy MR. Adhesion molecules as therapeutic targets for autoimmune diseases and transplant rejection. *Expert Opin Biol Ther*, 2003; 3(1):85-95.
144. Hauser IA, Riess R, Hausknecht B et al: Expression of cell adhesion molecules in primary renal disease and renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 1997;12(6):1122-31
145. Iiyama K, et al. 1999. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ. Res.* 85:199-207.
146. Nakashima, Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18:842-851

147. Walker LN, Reidy MA, Bowyer DE. Morphology and cell kinetics of fatty streak lesion formation in the hypercholesterolemic rabbit. *Am. J. Pathol.* 1986;125:450-459.
148. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med.* 2002;252(4):283-94
149. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836-843.
150. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA.* 2001;285:2481-2485.
151. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation.* 2001;103:1813-1818.
152. Ridker PM, Rifai N, Rose L et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347:1557-1565.
153. Wang CH, Li SH, Weisel RD, et al. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation.* 2003;107:1783-1790.
154. Verma S, Wang CH, Weisel RD, et al. Hyperglycemia potentiates the proatherogenic effects of C-reactive protein: reversal with rosiglitazone. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:417-419.
155. Yeh ET, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation.* 2003;107:370-372.
156. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation.* 2003;107:363-369.
157. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 2003;107:398-404.
158. Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* 2002;106:913-919.
159. Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation.* 2002;105:1890-1896.
160. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat. Med.* 2007;13:1176-1184.
161. Gonen B, Cole T, Hahm KS. The interaction of carbamylated low-density lipoprotein with cultured cells. Studies with human fibroblasts, rat peritoneal macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1983;754:201-207.
162. Kraus LM, Kraus Jr AP. Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int Suppl* 2001;78:102-107.

163. Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF et al. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 1547-1560.
164. Apostolov EO, Ray D, Savenka AV et al. Chronic uremia stimulates LDL carbamylation and atherosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:1852-1857.
165. Ok E, Basnakian AG, Apostolov EO et al. Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68:173-178.
166. Kaysen GA. The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1549-1557.
167. Lewis KE, Kirk EA, McDonald TO et al. Increase in serum amyloid as evoked by dietary cholesterol is associated with increased atherosclerosis in mice. *Circulation* 2004;110:540-545.
168. Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC et al. Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation* 2004;109:726-732.
169. Bang CA, Bro S, Bartels ED et al. Effect of uremia on HDL composition, vascular inflammation, and atherosclerosis in wild-type mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:1325-1331.
170. Danovitch GM. *Handbook of Kidney Transplantation*. 2010. Lippincott Williams Wilkins.
171. Zoccali C, Mallamaci F, Parlongo S. Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease. *Circulation* 2002;105:1354-1359.
172. Converse RL Jr, Jacobsen TN, Toto RD, Jost CM, Cosentino F, Fouad-Tatazi F, Victor RG. Sympathetic overactivity in patients with chronic renal failure. *N Engl J Med* 1992;327:1912-1918.
173. Rassaf T, Westenfeld R, Balzer J, et al. Modulation of peripheral chemoreflex by neurohumoral adaptations after kidney transplantation. *Eur J Med Res* 2010;15(2):83-87.
174. Beretta-Piccoli C, Weidmann P, Schiffli H, Cottier C, Reubi FC. Enhanced cardiovascular pressor reactivity to norepinephrine in mild renal parenchymal disease. *Kidney Int* 1982;22:297-303.
175. Ishii M, Ikeda T, Takagi M, et al. Elevated plasma catecholamines in hypertensives with primary glomerular diseases. *Hypertension* 1983;5:545-551.
176. Eisenhofer G, Rundquist B, Aneman A, et al. Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3009-3017.
177. Ziegler MG, Morrissey EC, Kennedy B, Elayan H. Sources of urinary catecholamines in renal denervated transplant recipients. *J Hypertens* 1990; 8:927-931.
178. Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation* 2003;108:560-565.

179. Esler M. The autonomic nervous system and cardiac arrhythmia. *Clin Auton Res* 1992;2:133-135.
180. Xu J, Li G, Wang P, Velazquez H, Yao X, Li Y, et al. Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure. *J Clin Invest* 2005;115:1275-80.
181. Desir G. Novel insights into the physiology of renalase and its role in hypertension and heart disease. *Pediatr Nephrol.* 2012;27:719-725.
182. Hennebry SC, Eikelis N, Socratous F, et al. Renalase, a novel soluble FAD-dependent protein, is synthesized in the brain and peripheral nerves. *Mol Psychiatry.* 2010;15:234-236.
183. Wang J, Qi S, Cheng W, et al. Identification, expression and tissue distribution of a renalase homologue from mouse. *Mol Biol Rep* 2008;35:613-620.
184. Li G, Xu J, Wang P, et al. Catecholamines regulate the activity, secretion, and synthesis of renalase. *Circulation.* 2008; 117: 1277-1282.
185. Desir GV. et al. Human Renalase: A Review of Its Biology, Function, and Implications for Hypertension *Journal of the American Society of Hypertension* 2012;6:417-426.
186. Wu Y, Xu J, Velazquez H, Wang P, Li G, Liu D, et al. Renalase deficiency aggravates ischemic myocardial damage. *Kidney Int* 2011;79:853-60.
187. Weinman EJ, Biswas R, Steplock D, Wang P, Lau YS, Desir GV, et al. Increased renal dopamine and acute renal adaptation to a high-phosphate diet. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:1123-9.
188. Desir GV, Tang L, Wang P, et al. Renalase lowers ambulatory blood pressure by metabolizing circulating catecholamines. *J Am Heart Assoc* 2012;1:e002634.
189. Baraka A, El Ghotny S. Cardioprotective effect of renalase in 5/6 nephrectomized rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2012;17(4):412-6.
190. Lee HT, Kim JY, Kim M, et al. Renalase protects against ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(3):445-55.
191. Kasisike et al. KDIGO clinical practice guideline for kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation* 2009; 9 (3):2-155.
192. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR et al. KDIGO clinical practice guideline for care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int* 2010;77:299.
193. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31-41.
194. <http://www.minzdravlja.info/downloads/2011/Decembar/Vodic/VodicZaDijagno stikovanjeILecenjeLipidskihPoremecaja.pdf>
195. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
196. Paroni R, Fermo I, Fiorina P, Cighetti G. Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in plasma of hyperhomocysteinemic subjects. *Amino Acids* 2005;28:389.
197. Navaro-Gonzalvez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998;44:679.
198. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(9):1135-1143.

199. Pallardo Mateu LM, Sancho Calabuig A, Capdevila Plaza L et al. Acute rejection and late renal transplant failure: Risk factors and prognosis. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(3):38–42.
200. Ovuworie CA, Fox ER, Chow CM, Pascual M, Shih VE, Picard MH, et al. Vascular endothelial function in cyclosporine and tacrolimus treated renal transplant recipients. *Transplantation* 2001;72:1385.
201. Annuk M, Lind L, Linder T, Fellstrom B. Impaired endothelium-dependent vasodilation in renal failure in humans. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 302.
202. Huseyin Oflaz, Aydin Turkmen, Faruk Turgut, Changes in endothelial function before and after renal transplantation. *Transplant International* 2006;19,333–337.
203. Mercanoglu F, Oflaz H, Turkmen A, et al. Does the endothelial function change in renal transplant patients with longer duration of exposure and with higher cumulative doses of cyclosporine? *Transplant Proc* 2004;36:1361
204. Oflaz H, Pusuroglu H, Genchallac H, et al. Endothelial function is more impaired in hemodialysis patients than renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2003; 17:528.
205. Gallego MJ, Garcia Villanlon AL, Lopez-Farre AJ, et al. Mechanisms of endothelial cell toxicity of cyclosporine A. Role of nitric oxide, cGMP and calcium. *Cir Res* 1994;74:477.
206. Calo LA, Semplicini A, Davis PA, et al. Cyclosporine induced endothelial dysfunction and hypertension: are nitric oxide system abnormality and oxidative stress involved? *Transpl Int* 2000;13(Suppl. 1):413.
207. Connolly G, Cunningham R, McNamee P, Young I, Maxwell A. Elevated soluble cellular adhesion molecules are associated with increased mortality in a prospective cohort of renal transplant recipients. *BMC Nephrology* 2011;12-23.
208. Trinanés J, Salido E, Fernández J et al. Type 1 Diabetes Increases the Expression of Proinflammatory Cytokines and Adhesion Molecules in the Artery Wall of Candidate Patients for Kidney Transplantation. *Diabetes Care* 2012;35:427-433.
209. Cybulsky M, Iiyama K, Li H et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1 in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;7:1255-1262.
210. Komatsu S, Panes J, Russell JM et al. Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997;29(2):683-689.
211. Bonomini M, Reale M, Santarelli P, Stuard S, Settefrati N, Albertazzi A. Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron* 1998;79(4):399-407.
212. Stenvinkel P, Lindholm B, Heimbürger M, Heimbürger O. Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in pre-dialysis patients: association with malnutrition, inflammation, and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(10):1624-1630.
213. Suliman ME, Qureshi AR, Heimbürger O, Lindholm B, Stenvinkel P. Soluble adhesion molecules in end-stage renal disease: a predictor of outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(6):1603-1610.
214. Moore R, Hernandez D, Valentine H. Calcineurin inhibitors and post-transplant hyperlipidaemias. *Drug Saf* 2001;24:755-766.

215. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 1998; 339:1349-1357.
216. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307.
217. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996; 335: 1001-1009.
218. Downs JR, Clearfield M, Weis S et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998;279:1615-1622.
219. Serruys PW, de Feyter P, Macaya C et al. for the Lescol Intervention Prevention Study (LIPS) Investigators. Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 287:3215-3222.
220. Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomized controlled trial. *Lancet* 2003;361:1149-1158.
221. Holdaas H, Fellstrom B, Jardine AG et al. on behalf of the Assessment of Lescol in Renal Transplantation (ALERT) Study Investigators. Effect of fluvastatin on cardiac outcomes in renal transplant recipients: a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 2024-2031.
222. Massy ZA, Kasiske BL. Post-transplant hyperlipidemia: Mechanisms and management. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:971-977.
223. Kasiske BL. Hyperlipidemia in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998;32(Suppl 3):142-156.
224. Henry ML. Cyclosporine and tacrolimus (FK506): A comparison of efficacy and safety profiles. *Clin Transplant* 1999;13:209-220.
225. Kasiske BL. Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med* 1988;84:985-992.
226. Kasiske BL, Guijarro C, Massy ZA, et al. Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:158-165.
227. Kasiske BL, Chakkera HA, Roel J. Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1735-1743.
228. Aker S, Ivens K, Grabensee B, Heering P. Cardiovascular risk and diseases after renal transplantation. *Int Urol Nephrol* 1998;30:777-788.
229. Roodnat JI, Mulder PG, Zietse R, et al. Cholesterol as an independent predictor of outcome after renal transplantation. *Transplantation* 2000 ;69:1704-1710.

230. Zakrzewicz D, Zakrzewicz A, Wilker S, et al. Dimethylarginine metabolism during acute and chronic rejection of rat renal allografts. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:124-135.
231. Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, et al. Endothelial functions improve with decrease in asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels after renal transplantation. *Transplantation* 2005;80:1660-1666.
232. Zhang W, Zhou C, Xie J, Chen B, Chang L. Serum asymmetric dimethylarginine and endothelial function after renal transplantation. *J. Cent. South Univ. (Med. Sci.)* 2009;34:289-294.
233. Zoccali, C. Endothelial damage, asymmetric dimethylarginine and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Blood Purif.* 2002;20:469-476..
234. Andrade F, Rodríguez-Soriano J, Prieto JA, Aguirre M, Ariceta G, Lage S, Azcona I, Prado C, Sanjurjo P, Aldámiz-Echevarría L. Methylation cycle, arginine-creatine pathway and asymmetric dimethylarginine in paediatric renal transplant. *Nephrol. Dial. Transpl.* 2011;26:328-336.
235. Teplan V, Schück O, Racek J, Siroka R, Haluzik M, Kudla M, Vitko S. Asymmetric dimethylarginine and adiponectin after renal transplantation: Role of obesity. *J Ren Nutr.* 2009;18:154-157.
236. Teplan V, Malý J, Gürlich R, Teplan V Jr, Kudla M, Pit'ha J, Racek J, Haluzik M, Senolt L, Stollová M. Muscle and fat metabolism in obesity after kidney transplantation: No effect of peritoneal dialysis or hemodialysis. *J. Ren. Nutr.* 2012;22:166-170.
237. Lin KY, Ito A, Asagami T et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987-992.
238. Fleck C, Janz A, Schweitzer F et al. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int Suppl* 2001;78:14-18.
239. Valgimigli M, Merli E, Malagutti P et al. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 2003;420:255-261.
240. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J et al. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:505-521.
241. Safar ME, Delahousse M, Bahous SA. Arterial stiffness and renal transplantation. *J Hypertens* 2008;26:2101-2102.
242. Verbeke F, Van BW, Peeters P et al. Arterial stiffness and wave reflections in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:3021-3027.
243. Seckinger J, Sommerer C, Hinkel UP et al. Switch of immunosuppression from cyclosporine A to everolimus: impact on pulse wave velocity in stable de-novo renal allograft recipients. *J Hypertens* 2008;26:2213-2219.
244. Strozecki P, Adamowicz A, Wlodarczyk Z et al. The influence of calcineurin inhibitors on pulse wave velocity in renal transplant recipients. *Ren Fail* 2007; 29: 679-684.

245. Potena L, Fearon WF, Sydow K et al. Asymmetric dimethylarginine and cardiac allograft vasculopathy progression: modulation by sirolimus. *Transplantation* 2008;85:827-833.
246. Abedini S, Holme I, Fellstrom B et al. Cerebrovascular events in renal transplant recipients. *Transplantation* 2009;87:112-117.
247. Kielstein JT, Donnerstag F, Gasper S et al. ADMA increases arterial stiffness and decreases cerebral blood flow in humans. *Stroke* 2006;37:2024-2029.
248. Kielstein JT, Fliser D, Veldink H. Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine: axis of evil or useful alliance? *Semi Dial* 2009;22:346-350.
249. Schepers E, Glorieux G, Dhondt A et al. Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1429-1435.
250. Schramm L, La M, Heidebreder E, et al. L-arginine deficiency and supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation. *Kidney Int* 2002;61:1423-1432.
251. Lee PC, Wang ZL, Qian S, et al: Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 2000;69:1186-1192.
252. Basset EA, Berthoux P, Cecillon S, et al: Hypertension after renal transplantation and polymorphism of genes involved in essential hypertension: ACE, AGT, AT1 R and eNOS. *Clin Nephrol* 2002;57:192-200.
253. Prins HA, Nijveldt RJ, Gasselt DV, et al: The flux of arginine after ischemia-reperfusion in the rat kidney. *Kidney Int* 2002;62:86-93.
254. Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, et al: Effects of tetrahydrobiopterin on endothelial dysfunction in rats with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:301-309.
255. Castillo J, Berrazueta JR, Herrera L, et al: Nitric oxide and endothelins are effector agents of hyperacute vascular rejection. *Transplant Proc* 1996;28:635.
256. Kelly BS, Alexander JW, Dreyer D, et al: Oral arginine improves blood pressure in renal transplant and hemodialysis patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001;25:194-202.
257. Andres A, Morales JM, Praga M, et al: L-arginine reverses the antinatriuretic effect of cyclosporin in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:1437-1440.
258. Koomans HA, Blankestijn PJ, Joles JA. Sympathetic hyperactivity in chronic renal failure: a wake-up call. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:524-537.
259. Schlaich MP, Socratous F, Hennebry S, et al. Sympathetic activation in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:933-939.
260. Rigatto C, Parfery P, Foley R, Negrijn C, Tribula C, Jeffery J. Congestive heart failure in renal transplant recipients: risk factors, outcomes, and relationship with ischemic heart disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1084-1090.
261. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003; 108: 2154-2169.

262. Hernandez D, Rufino M, Bartolomei S et al. A novel prognostic index for mortality in renal transplant recipients after hospitalization. *Transplantation* 2005; 79:337-343.
263. Hausberg M, Kosch M, Harmelink P. Sympathetic Nerve Activity in End-Stage Renal Disease. *Circulation* 2002;106:1974-1979.
264. Campese VM, Kogosov E. Renal afferent denervation prevents hypertension in rats with chronic renal failure. *Hypertension*. 1995;25:878–882.
265. Ye S, Ozgur B, Campese VM. Renal afferent impulses, the posterior hypothalamus, and hypertension in rats with chronic renal failure. *Kidney Int.* 1997;51:722-727.
266. DiBona GF, Jones SY, Kopp UC. Renal mechanoreceptor dysfunction: an intermediate phenotype in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;33:472-475.
267. Ye S, Gamburd M, Mozayeni P, et al. A limited renal injury may cause a permanent form of neurogenic hypertension. *Am J Hypertens.* 1998;11:723–728.
268. Katholi RE, Whitlow PL, Hageman GR, et al. Intrarenal adenosine produces hypertension by activating the sympathetic nervous system via the renal nerves in the dog. *J Hypertens.* 1984;2:349-259.
269. Biaggioni I. Contrasting excitatory and inhibitory effects of adenosine in blood pressure regulation. *Hypertension*. 1992;20:457–465.
270. Ligtenberg G, Blankestijn PJ, Oey PL, et al. Reduction of sympathetic hyperactivity by enalapril in patients with chronic renal failure. *N Engl J Med.* 1999;340:1321-1328.
271. Lyson T, Ermel LD, Belshaw PJ, et al. Cyclosporine- and FK506-induced sympathetic activation correlates with calcineurin-mediated inhibition of T-cell signaling. *Circ Res.* 1993;73:596–602.
272. Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, et al. Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med.* 1990;323:693-699.
273. Rundqvist B, Elam M, Eisenhofer G, et al. Normalization of total body and regional sympathetic hyperactivity in heart failure after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15:516-526.
274. Kaye D, Thompson J, Jennings G, et al. Cyclosporine therapy after cardiac transplantation causes hypertension and renal vasoconstriction without sympathetic activation. *Circulation.* 1993;88:1101-1109.
275. Malyszko J, Malyszko JS, Mysliwiec M. Serum neutrophil gelatinase associated lipocalin correlates with kidney function in renal allograft recipients. *Clin Transplant* 2009;68:681-686.
276. Zbroch E, Małyszko J, Małyszko J, Żorawska EK, Myśliwiec M. Renalase, kidney function, and markers of endothelial dysfunction in renal transplant recipients. *Pol Arch Med Wewn* 2012;122 (1-2):40-44.
277. Przybyłowski P, Żorawska EK, Malyszko JS, Mysliwiec M, Malyszko J. Renalase and Endothelial Dysfunction in Heart Transplant Recipients. *Transplan Proc* 2013;45:394-396.
278. Desir GV. Novel insights into the physiology of renalase and its role in hypertension and heart disease *Pediatr Nephrol* 2012;27:719–725.

279. Wu Y, Velazquez H, Xu J, et al. Renalase deficiency aggravates ischemic myocardial damage. *Kidney Int* 2011;79:853-60.
280. Masuo K, Lambert GW, Esler MD, et al. The role of sympathetic nervous activity in renal injury and end-stage renal disease. *Hypertens Res* 2010;33:521-528.
281. Schlaich MP. Sympathetic Activation in Chronic Kidney Disease: Out of the Shadow. *Hypertension* 2011;57:683-685.
282. Desir G, Tang L, Wang P, et al. Renalase Lowers Ambulatory Blood Pressure by Metabolizing Circulating Adrenaline. *J Am Heart Assoc* 2012;1:e002634 doi: 10.1161/JAHA.112.002634.
283. Desir G. Regulation of blood pressure and cardiovascular function by renalase. Cardiac function and blood pressure by renalase. *Kidney International* 2009;76:366-370.
284. Malyszko J, Zbroch E, Malyszko JS, Zorawska EK, Mysliwiec M. Renalase, A Novel Regulator of Blood Pressure, Is Predicted by Kidney Function in Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc* 2011;43:(8)3004-3007.
285. Przybylowski P, Malyszko J, Kozłowska S, Malyszko J, Zorawska E, Koc M, Mysliwiec. Serum Renalase Depends on Kidney Function But Not on Blood Pressure in Heart Transplant Recipients. *Transplant Proc* 2011;43:(10)3888-3891.
286. Zbroch E, Malyszko J, Malyszko JS, Zorawska E, Mysliwiec M. Renalase, a Novel Enzyme Involved in Blood Pressure Regulation, Is Related to Kidney Function but Not to Blood Pressure in Hemodialysis Patients. *Kidney Blood Press Res* 2012;35:395-399.
287. Zbroch E, Małyszko J, Małyszko J, Żorawska EK, Myśliwiec M. Renalase, kidney function, and markers of endothelial dysfunction in renal transplant recipients. *Pol Arch Med Wewn* 2012;122 (1-2):40-44.
288. Siddiqi L, Joles JA, Grassi G, Blankestijn PJ. Is kidney ischemia the central mechanism in parallel activation of the renin and sympathetic system? *J Hypertens* 2009; 27: 1341–1349, 2009.
289. Grassi G, Seravalle G, Ghiadoni L, et al. Sympathetic Nerve Traffic and Asymmetric Dimethylarginine in Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:2620–2627.
290. Anavekar NS, McMurray JJ, Velazquez EJ, et al. Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *N Eng J Med* 2004;351:1285–1295.
291. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Eng J Med* 2004;351:1296–1305.
292. Wolfe RA, Valerie A, Milford EL et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Eng J Med* 1999;341:1725-1730.
293. Seron D, Gomez Ullate P, Gutierrez-Colon JA, Lampreabe I, Ruiz-Millan JC, Rengel M. Early post-transplant renal allograft function between 1990 and 1998 in Spain. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(13):43-46.
294. Gill JS, Tonelli M, Mix CH, Pereira BJ. The change in allograft function among long-term kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 136–142

295. Meier-Kriesche H-U, Baliga R, Kaplan B. Decreased renal function is a strong risk factor for cardiovascular death after renal transplantation. *Transplantation* 2003;75:1291-1295.
296. Fellstrom B, Jardine AG, Soveri I et al. Renal dysfunction is a strong and independent risk factor for mortality and cardiovascular complications in renal transplantation. *Am J Transplant* 2005;5:1986-1991.
297. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Reed A, Kaplan B. Kidney transplantation halts cardiovascular disease progression in patients with end-stage renal disease. *Am J Transplant* 2004;4:1662-1668.
298. Kasiske BL, O'Donnell MP, Garvis WJ, Keane WF. Pharmacologic treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in rat 5/6 nephrectomy model of chronic renal failure. *Circ Res* 1988;62:367-374.
299. Kasiske BL, O'Donnell MP, Schmitz PG, Kim Y, Keane WF. Renal injury of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Kidney Int* 1990; 37: 880–891.
300. Samuelsson O, Mulec H, Knight-Gibson C et al. Lipoprotein abnormalities are associated with increased rate of progression of human chronic renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:1908-1915.
301. Lee HT, Kim JY, Kim M, et al. Renalase protects against ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(3):445-55.
302. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002;346: 580-590.
303. Ponticelli C, Villa M, Cesana B, Montagnino G, Tarantino A. Risk factors for late kidney allograft failure. *Kidney Int* 2002;62:1848-1854.
304. Silkesen JR. Long-term complications in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:582-588.
305. Kasiske BL. Epidemiology of cardiovascular disease after renal transplantation. *Transplantation* 2001;72(6):5-8.
306. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: Immunologic and nonimmunological risk factors. *Kidney Int* 1996;49:518-524.
307. Mayer AD for the European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group. Chronic rejection and graft half-life: five-year follow-up of the European tacrolimus multicenter renal study. *Transplant Proc* 2002;34:1491-1492.
308. Vincenti F, Jensik SC, Filo RS, Miller J, Pirsch J. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. *Transplantation* 2002;73:775-782.
309. Margreiter R for the European Tacrolimus vs Cyclosporin Microemulsion Renal Transplantation Study Group. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet* 2002;359:741-746.
310. Montagnino G, Kramer BK, Arias M for the European Tacrolimus vs Cyclosporin Microemulsion Renal Transplantation Study Group. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporine microemulsion in kidney transplantation: twelvemonth follow-up. *Transplant Proc* 2002;34:1635–1637.

311. Vanrenterghem Y. Role of acute rejection in chronic rejection. *Transplant Proc* 1998;30:1210-1211.
312. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000;342:605-612.
313. Baboolal K, Jones GA, Janezic A, Griffiths DR, Jurewicz WA. Molecular and structural consequences of early renal allograft injury. *Kidney Int* 2002;61:686-696.
314. Bicknell GR, Williams ST, Shaw JA, Pringle JH, Furness PN, Nicholson ML. Differential effects of cyclosporin and tacrolimus on the expression of fibrosis-associated genes in isolated glomeruli from renal transplants. *Br J Surg* 2000;87:1569-1575.
315. Klein IHHT, Abrahams A, van Ede T, Hene RJ, Koomans HA, Ligtenberg G. Different effects of tacrolimus and cyclosporine on renal hemodynamics and blood pressure in healthy subjects. *Transplantation* 2002;73:732-736.
316. Radermacher J, Meiners M, Bramlage C et al. Pronounced renal vasoconstriction and systemic hypertension in renal transplant patients treated with cyclosporin A versus FK506. *Transplant Int* 1998;11:3-10.
317. Jurewicz WA. Tacrolimus vs cyclosporin immunosuppression: long-term outcome in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18[Suppl 1]:7-11.
318. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection. *Transplantation* 1997;64:436-443.
319. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS: A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1997;63:977-983,.
320. Friemann S, Feuring E, Padberg W, Ernst W. Improvement of nephrotoxicity, hypertension and lipid metabolism after conversion of kidney transplant recipients from cyclosporine to tacrolimus. *Transplant Proc* 1998;30: 1240-1242.
321. Jensik SC, and the FK506 Kidney Transplant Study Group: Tacrolimus (FK506) in Kidney Transplantation: Three-Year survival results of the US multicenter, randomized, comparative trial. *Transplant Proc* 1998;30:1216-1218.
322. Ligtenberg G, Hene RJ, Blankestijn PJ, Koomans HA. Cardiovascular risk factors in renal transplant patients: cyclosporin A versus tacrolimus. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:368-373.
323. Kramer BK, Zulke C, Kammerl MC et al. Cardiovascular risk factors and estimated risk for CAD in a randomized trial comparing calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Am J Transplant* 2003;3:982-987.
324. Kramer BK, Montagnino M, Castillo D, et al. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin A microemulsion in renal transplantation: 2 year follow-up results. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:968-973.
325. Gill JS, Tonelli M, Mix CH, Johnson N, Pereira BJG. The effect of maintenance immunosuppression medication on the change in kidney allograft function. *Kidney Int* 2004;65:692-699.
326. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2003;3:178-185.

327. Textor SC, Canzanello VJ, Taler SJ, et al. Cyclosporine-induced hypertension after transplantation. *Mayo Clin Proc* 1994;69:1182-1193.
328. Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, Rollins JA, Tindall RS, Ring S, Hanson P, Mohanty PK, Victor RG: Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med* 1990;323:693-699.
329. Richards NT, Poston L, Hilton PJ: Cyclosporine A inhibits endothelium-dependent, prostanoid-induced relaxation in human subcutaneous resistance vessels. *J Hypertens* 1990;8:159-163.
330. Stein CM, He H, Pincus T, Wood AJ. Cyclosporine impairs vasodilation without increased sympathetic activity in humans. *Hypertension* 1995;26:705-710.
331. Bantle JP, Boudreau RJ, Ferris TF: Suppression of plasma renin activity by cyclosporine. *Am J Med* 1987;83:59-64.
332. Morgan BJ, Lyson T, Scherrer U, Victor RG: Cyclosporine causes sympathetically mediated elevations in arterial pressure in rats. *Hypertension* 1991;18:458-466.
333. Lyson T, Ermel LD, Belshaw PJ, Alberg DG, Schreiber SL, Victor RG: Cyclosporine- and FK506-induced sympathetic activation correlates with calcineurin-mediated inhibition of T-cell signaling. *Circ Res* 73: 596-602, 1993
334. Ryuzaki M, Stahl LK, Lyson T, Victor RG, Bishop VS: Sympathoexcitatory response to cyclosporine A and baroreflex resetting. *Hypertension* 1997; 29:576-582.
335. Amore A, Gianoglio B, Ghigo D, et al. A possible role for nitric oxide in modulating the functional cyclosporine toxicity by arginine. *Kidney Int* 1995;47: 1507-1514.
336. Textor SC, Burnett JC, Romero JC, et al. Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int* 1995;47:1426-1433.
337. Moutabarrik A, Ishibashi M, Fukunaga M, et al. Takahara S. FK506-induced kidney tubular cell injury. *Transplantation* 1992;54:1041-1047.
338. Marumo T, Nakaki T, Hishikawa K, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Cyclosporin A inhibits nitric oxide synthase induction in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995;25:764-768.
339. Canzanello VJ, Textor SC, Taler SJ, et al. Renal sodium handling with cyclosporin A and FK506 after orthotopic liver transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1910-1917.
340. van den Dorpel MA, van den Meiracker AH, Lameris TW, Boomsma F, Levi M, Man in't Veld AJ, Weimar W, Schalekamp MA: Cyclosporin A impairs the nocturnal blood pressure fall in renal transplant recipients. *Hypertension* 1996;28:304-307.
341. Verdecchia P, Schillaci G, Guerrieri M, Gatteschi C, Benemio G, Boldrini F, Porcellati C. Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Circulation* 1990;81:528-536.
342. Rayyes OA, Wallmark A, Floren CH: Cyclosporine inhibits catabolism of low-density lipoproteins in HepG2 cells by about 25%. *Hepatology* 1996;24:613-619.

Lista skraćenica

ADMA	asimetrični dimetilarginin
ACEI	inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima
AKI	acute kidney injury; akutna povreda bubrega
ANOVA	analiza varijanse
ATP	adenozin trifosfat
BH ₄	tetrahidrobiopterin
CRP	C-reaktivni protein
CYC	ciklosporin
DDAH	dimetilarginin dimetil aminohidrolaza
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAD	flavin adenin dinukleotid
GMP	guanozin monofosfat
ICAM-1	intracelularni adhezioni celularni molekul
IQR	interkvartilna razlika
ITM	indeks telesne mase
HBI	hronična bubrežna insuficijencija
HDL	high density holesterol, holesterol velike gustine
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi
JGF	jačina glomerulske filtracije
KNI	kalcineurinski inhibitori
KVB	kardiovaskularne bolesti
L-NMMA	asimetrični izomer monometil L-arginin
LDL	low density holesterol; holesterol male gustine
MAO	monoamino oksidaza
MACE	major adverse cardiovascular events; najznačajniji neželjeni kardiovaskularni događaj
MMF	mikofenolat mofetil
MSNA	muscle nerve sympathetic activity, simpatička aktivnost merena tremorom mišića
NADP	nikotinamid adenin dinuklotid
NFκβ	nuklearni faktor κβ
NO	azot oksid
NOS	azot oksid sintaza
OR	odds ratio, unakrsni odnos šansi
p	prag značajnosti
PCR	polymerase chain reaction; lančana reakcija polimeraze
PRMT1	protein arginin metiltransferaza tip 1
PRMT2	protein arginin metiltransferaza tip 2
RAAS	renin angiotenzin aldosteron sistem
SAA	serumski amiloid A
SDMA	simetrični dimetilarginin
SNS	simpatički nervni sistem

vs	u odnosu, prema
VCAM-1	vaskularni adhezioni celularni molekuli
VLDL	very low density lipoprotein; lipoprotein veoma male gustine
95% CI	95% interval poverenja

Lista tabela

Tabela 1. Fiziološki efekat ADME u zavisnosti od aktivnosti azot monoksida.....	15
Tabela 2. Karakteristike i neželjena dejstva kalcineurinskih inhibitora.....	31
Tabela 3. Sindromi nefrotoksičnosti indukovane kalcineurinskim inhibitorima.....	32
Tabela 4. Lipidni status kod odraslih osoba sa poželjnim i rizičnim vrednostima.....	45
Tabela 5. Osnovne demografske i kliničke karakteristike 73 pacijenta sa transplantatom uključenih u istraživanje.....	50
Tabela 6. Distribucija faktora rizika kod 73 pacijenata sa transplantatom.....	51
Tabela 7. Klinički i biohemijski parametri pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu.....	52
Tabela 8. Lipidni status kod pacijenata sa transplantatom u poređenju sa kontrolnom grupom.....	53
Tabela 9. Razlike u ispitivanim parametrima endotelne disfunkcije i renalaze između pacijenata sa transplantatom i kontrolne grupe.....	54
Tabela 10. Univarijantni ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) za smanjenje jačine glomerulske filtracije ($JGF < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) u odnosu na ukupni holesterol, HDL, LDL, Tg, non-HDL i lipidne odnose: LDL/HDL, ukupni holesterol/HDL, non-HDL/HDL.....	55
Tabela 11. Ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) nakon prilagođavanja za godine za smanjenje jačine glomerulske filtracije ($JGF < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) u odnosu na ukupni holesterol, HDL, LDL, Tg, non-HDL i lipidne odnose: LDL/HDL, ukupni holesterol/HDL, non-HDL/HDL.....	56
Tabela 12. Multivarijantni ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) za smanjene jačine glomerulske filtracije ($JGF < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) u odnosu na ukupni holesterol, HDL, LDL, TG, non-HDL i lipidne odnose: LDL/HDL, ukupni holesterol/HDL, non-HDL/HDL.....	58
Tabela 13. Univarijantni (OR) i 95% interval poverenja (CI) za smanjenje smanjene jačine glomerulske filtracije ($JGF < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) u odnosu na koncentracije ICAM-1, VCAM-1, nitrate (NO_2/NO_3), eNOS, ADMA, SDMA i renalazu.....	59
Tabela 14. Ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) nakon prilagođavanja za godine za smanjenje jačine glomerulske filtracije ($JGF < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) u odnosu na ICAM-1, VCAM-1, nitrate (NO_2/NO_3), eNOS, ADMA, SDMA i renalazu.....	60
Tabela 15. Multivarijantni ods ratio (OR) i 95% interval poverenja (CI) za smanjenje jačine glomerulske filtracije $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ u odnosu na ICAM-1, VCAM-1, nitrate (NO_2/NO_3), eNOS, ADMA, SDMA i renalazu.....	60
Tabela 16. Koncentracija renalaze u plazmi u odnosu na jačinu glomerulske filtracije kod pacijenata sa transplantatom.....	61
Tabela 17. Korelaciona analiza između renalaze, lipidnih parametara, bubrežne funkcije i parametara endotelne disfunkcije i inflamacije.....	63
Tabela 18. Koeficijent korelacije između parametara nitrozativnog stresa i bubrežne funkcije kod pacijenata sa transplantatom.....	67
Tabela 19. Klinički i biohemijski parametri kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol.....	67

Tabela 20. Razlike u ispitivanim lipidnim parametrima kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol.....68

Tabela 21. Razlike u ispitivanim parametrima kod pacijenata sa transplantatom u odnosu na primenjeni imunosupresivni protokol.....68

Lista grafikona

Grafikon 1. Etiologija hronične bubrežne slabosti.....	50
Grafikon 2. Korelaciona analiza između JGF i renalaze.....	64
Grafikon 3. Korelaciona analiza između ukupnog holesterola i renalaze.....	65
Grafikon 4. Korelaciona analiza između LDL-holesterola i renalaze.....	65
Grafikon 5. Korelaciona analiza između kreatinina i renalaze.....	66

Lista slika

Slika 1. Sinteza azot monoksida i mehanizam relaksacije glatkomišićne ćelije.....	6
Slika 2. Građa i metabolizam azot monoksid sintaze.....	9
Slika 3. Mehanizmi oštećenja endotela.....	10
Slika 4. Struktura endogenih metilarginina.....	13
Slika 5. Sinteza i metabolizam dimetilarginina.....	15

Biografija autora

Dijana Stojanović (rođena Mušović) doktor medicine, rođena je u Nišu 04.08.1976. godine. Osnovnu školu i gimnaziju „Bora Stanković“ završila je u Nišu. Fakultet je upisala 1996. godine i diplomirala 2004. godine sa prosečnom ocenom 9,16 i ocenom 10 na diplomskom ispitu odbranjenom na temu Parkinsonova bolest. Doktorske akademske studije upisala je 2007. godine kao prvoplasirana na listi. Aktivno se služi računarom, tečno govori engleski jezik, a služi se francuskim i španskim jezikom.

Dijana Stojanović radi na Institutu za patofiziologiju od 2009. godine, trenutno je u zvanju asistenta. U okviru naučnog usavršavanja provela je mesec dana na Medicinskom fakultetu u Mariboru u laboratoriji za ćelijsku kulturu. Radi kao istraživač na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije „Monitoring elektromagnetnih zračenja mobilnih telekomunikacionih sistema u životnoj sredini, analiza molekularnih mehanizama i biomarkera oštećenja kod hronične izloženosti sa razvojem modela za procenu rizika i metoda za zaštitu“ (Br.43012). Trenutno je na četvrtoj godini specijalizacije iz interne medicine. Autor je i koautor 12 radova na SCI listi (M22-23). Član je Lekarske komore Srbije i Evropskog udruženja za dijalizu i transplantaciju EDTA i sekretar Balkanske medicinske unije.