

EVALUATION OF THE -318C/T (RS5742909) CTLA4 GENE POLYMORPHISM INFLUENCE ON KIDNEY FUNCTION AFTER TRANSPLANTATION

ISPITIVANJE UTICAJA POLIMORFIZMA -318C/T (RS5742909) CTLA4 GENA NA FUNKCIJU BUBREGA NAKON TRANSPLANTACIJE

Nevena Veljančić¹, Vladimir Perović^{1,2}

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

Correspondence: veljancicn16@gmail.com

Abstract

Introduction: The protein CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4) is a molecule that plays a significant role in maintaining immunological homeostasis. Recent studies demonstrated an unequivocal proof that CTLA-4 has an inhibitory effect on immune response. This gene has been identified with several single nucleotide polymorphisms which could change gene activity, consequently leading to structural protein change. This genetic variability is associated with acute rejection and delayed graft function as important indicators of kidney transplantation success.

Aim: The aim of this study was to evaluate the potential association of CTLA4 (rs5742909) polymorphisms with acute rejection and delayed graft function in patients with kidney transplant.

Material and methods: A total of 151 patients were included in this cross-sectional cohort study. Real-time polymerase chain reaction was used to determine the genotype which was then evaluated in relation to acute rejection and delayed graft function. Statistical significance was analyzed by Pearson's Chi-square and Fisher's exact test.

Results: The most frequent genotype among 151 patient was CC (80.8%), then CT (17.9%) and TT (1.3%). The frequency of C allele is 89.7% whereas the frequency of T allele is 10.3%. There was no statistically significant difference in CTLA4 genotype and allele distribution nor their linkage to acute rejection and delayed graft function. The evaluation of C or T allele carriers showed no statistically significant difference with respect to previously mentioned posttransplant complications.

Conclusion: In this study, no statistically significant association between -318C/T (rs5742909) CTLA4 polymorphism and AR/DGF was found.

Keywords:

CTLA4,
polymorphism,
acute rejection,
delayed graft function

Sažetak

Uvod: Antigen 4 koji je udružen sa citotoksičnim T-limfocitima (engl. *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*, CTLA-4) je molekul koji ima značajnu ulogu u održavanju imunološke homeostaze. U dosadašnjim istraživanjima studije su nedvosmisleno pokazale negativnu ulogu CTLA-4 u aktivaciji T-ćelija. U strukturi gena koji kodira CTLA-4 pronađeni su polimorfizmi u okviru jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) koji bi potencijalno mogli da mijenjaju aktivnost gena a posljedično i proteinsku strukturu. Data genetička varijabilnost se dovodi u vezu sa akutnim odbacivanjem i odloženom funkcijom kalema kao bitnim pokazateljima uspješnosti transplantacije bubrega.

Cilj: Cilj studije je ispitivanje povezanosti -318C/T polimorfizma (rs5742909) u genu CTLA4 i akutnog odbacivanja, odnosno odložene funkcije kalema kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.

Materijal i metode: Ova studija presjeka obuhvatila je 151 ispitanika. Lančanom reakcijom polimerizacije u realnom vremenu (*RT-PCR*), baziranom na *TaqMan* metodi, utvrđen je genotip ispitanika koji je dalje analiziran u odnosu na podatke o akutnom odbacivanju i odloženoj funkciji kalema Pirsonovim Hi-kvadrat testom i Fišerovim testom tačne vjerovatnoće.

Rezultati: Kod 151 ispitanika najčešći je CC genotip (80,8%), zatim CT (17,9%) i TT (1,3%). Alel C ima učestalost 89,7%, a T-alel 10,3%. Nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji *CTLA4* genotipova i alela, kao ni njihova povezanost sa akutnim odbacivanjem i odloženom funkcijom kalema. Ispitivanje povezanosti nosilaca C-, odnosno T-alela i navedenih posttransplantacionih komplikacija takođe nije pokazalo statistički značajnu razliku.

Zaključak: U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna povezanost -318C/T (rs5742909) *CTLA4* polimorfizma sa akutnim odbacivanjem i odloženom funkcijom kalema nakon transplantacije.

Ključne reči:

CTLA4,
polimorfizam,
akutno odbacivanje,
odložena funkcija kalema

Uvod

Transplantacija bubrega je krajnji izbor pri liječenju pacijenata sa terminalnom insuficijencijom bubrega (engl. *End-stage kidney disease*). Bez obzira na etiologiju bubrežne disfunkcije, transplantacija je pokazala zavidne rezultate. Prethodna ispitivanja ishoda transplantacije u odnosu na dijalizu ukazala su na značajnu superiornost, naročito u kontekstu dugoročnog preživljavanja i poboljšanja kvaliteta života kao bitnih kriterijuma uspješnosti terapijskog metoda (1). Uprkos nesumnjivo velikom značaju, česte su posttransplantacione komplikacije. Odložena funkcija kalema (engl. *Delayed graft function*, DGF) i akutno odbacivanje (engl. *Acute rejection*, AR) najčešće su komplikacije na kojima će biti fokus u ovom radu. Zahvaljujući boljem razumijevanju neophodnih preduslova i značaja imunosupresivne terapije ostvaren je izuzetan napredak, iako prepreke nisu u potpunosti uklonjene. Organi preminulih davalaca dovode se u vezu sa lošijim dugoročnim preživljavanjem kalema/pacijenta (2). Period tople ishemije predstavlja vremenski interval od cirkulatornog zastoja do reperfuzije organa i njegovo produženje u značajnoj mjeri može uticati na kratkoročno, ali i na dugoročno preživljavanje kalema (3). Paradoksalno, uspostavljanjem protoka krvi nakon perioda ishemije dolazi do progresije ćelijskog oštećenja. Nastaju inflamatorna kaskada i oksidativno oštećenje posredovano reaktivnim oblicima kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), uz aktivaciju leukocita i produkciju proinflamatornih citokina, posebno interleukina-6 (IL-6) i tumorskog faktora nekroze (TNF)

(4). Imunski odgovor ima primarno protektivnu ulogu pri sticanju otpornosti na bolest, naročito infektivne etiologije. Specifičnost imunskog sistema je uspostavljanje tolerancije na sopstvene antigene, ali i efikasnost u odbrani od infekcije. U slučaju imunskog odgovora na transplantat, odbrambeni mehanizmi se aktiviraju na ćelije presađenog organa koje su prepoznate kao strane.

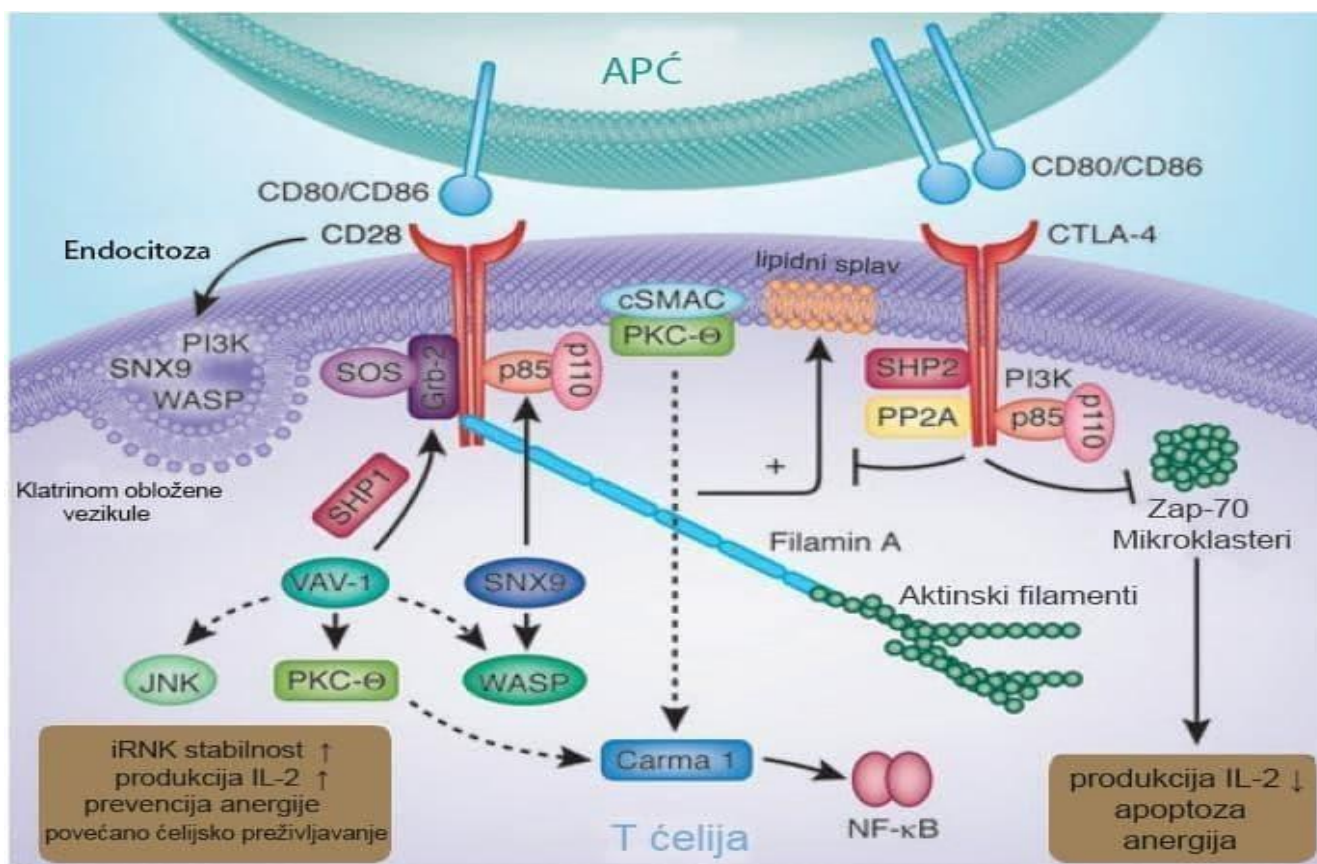
Akutno odbacivanje je vodeći razlog ranog odbacivanja kalema i posredovano je celularnim (T-ćelije), ali i humoralnim (imunoglobulini specifični za aloantigene kalema) imunskim odgovorom. U histopatološkom mehanizmu akutnog odbacivanja učestvuju CD4⁺ T-limfociti kroz privlačenje CD8⁺ T-ćelija, makrofaga, ćelija prirodnih ubica (engl. *Natural killer*, NK) i B-limfocita zaduženih za antitijelima posredovano akutno odbacivanje (5). CD8⁺ T-ćelije imaju direktno citotoksično dejstvo, indukujući apoptozu ciljne ćelije, dok Fc fragment imunoglobulina ima važnu ulogu u aktivaciji sistema komplemenata klasičnim putem, kao i aktivaciji NK ćelija (engl. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC). Saradnja urođenog i specifičnog imunskog odgovora ogleda se u snažnom inflamatornom odgovoru na aloantigene kalema. Polimorfizmi na nivou jednog nukleotida mogu modulirati imunski odgovor, ali i farmakodinamiku i farmakokinetiku imunosupresivne terapije. Zbog sve prisutnije upotrebe imunosupresivne terapije neophodno je razlikovati oštećenje organa posredovano nefrotoksičnim efektima imunosupresiva od akutnog odbacivanja. Histopatološke analize biopsije bubrega se rade u skladu sa internacionalno prihvaćenom Banf (*Banff*) klasifikacijom

(6). Karakterističan mononuklearni infiltrat bio je prisutan u 90% biopsija sa akutnim odbacivanjem (7).

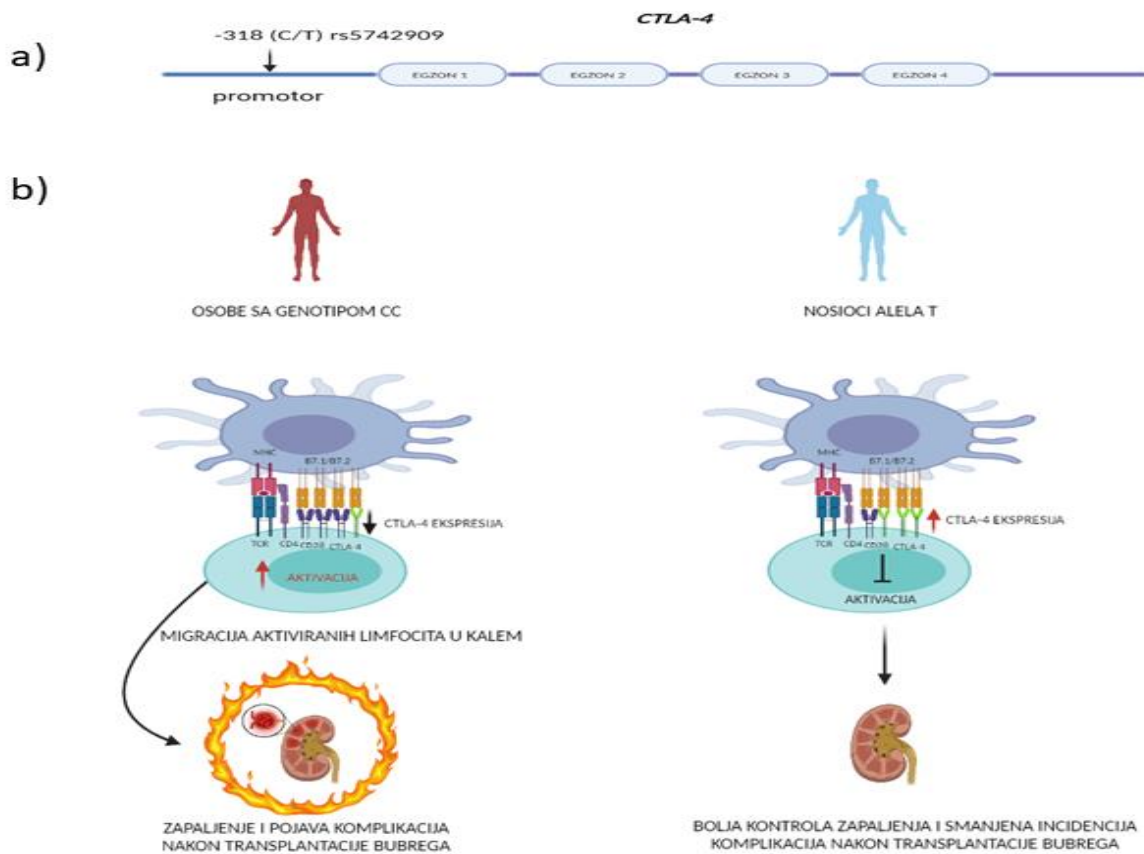
Dijagnoza odložene funkcije kalema (DFG) postavlja se na osnovu više kriterijuma. Otežavajuća okolnost je odsustvo univerzalne definicije i dijagnostičkog metoda za identifikaciju DGF, ali se faktori rizika grubo mogu grupisati u perioperativne i faktore u vezi sa donorom/primaocem. Organi koji se doniraju nakon srčane (engl. *Donation after cardiac death*, DCD) i moždane smrti (engl. *Donation after brain death*, DBD) osjetljiviji su na ishemiju i zahtijevaju brzo pristupanje operativnom zahvatu. Faktori rizika koji su u vezi sa primaocem organa uključuju pretransplantacionu dijalizu, prethodne transplantacije bubrega, ABO inkompatibiliju, prisustvo istorije dijabetesa, povišen indeks telesne mase (engl. *Body mass index*, BMI), pol i rasu (8).

Aktivacija T-ćelija zavisi od odnosa stimulatornih i inhibitornih signala. Antigen 4 koji je udružen sa citotoksičnim T-limfocitima (engl. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen-4*, CTLA-4) je molekul koji ima značajnu ulogu u prizastavljanju aktivacije T-ćelija. Prolazno je ispoljen na aktiviranim CD4⁺ T-ćelijama i konstitutivno na regulatornim T-ćelijama. Molekul CTLA-4 svoje inhibitorne efekte ispoljava pri interakciji sa B7-1, ali i sa B7-2 molekulima, uklanjajući ih sa površine antigen-prezentujućih ćelija (9). Pri

prezentaciji sopstvenih antigena i niske ekspresije B7 molekula aktiviran je visokoafinitetni CTLA-4 molekul. U slučaju povišene ekspresije B7 molekula, aktivirani koreceptor je CD28. Iako su geni za ove koreceptore smješteni na istom hromozomu (2q33) i pripadaju istoj porodici imunoglobulinskih koreceptora, CTLA-4 i CD28 imaju različite, skoro antagonističke efekte na ponašanje T-ćelija (10). Ekspresija CTLA-4 molekula nije ograničena samo na ćelijsku membranu. Specifičnost ovog molekula je internalizacija putem endocitoze, pri čemu molekul podliježe degradaciji ili se reciklira. S tim u vezi, ravnoteža u transportu je od izuzetnog značaja za funkciju ovog molekula (11) (slika 1). S obzirom na veoma važnu ulogu CTLA-4 molekula u inhibiciji T-ćelija, odnosno celularnog imunskog odgovora, pretpostavlja se da ovaj molekul može uticati na zapaljenje u transplantiranom organu, a samim tim i na pojavu ranih komplikacija kao što su AR i DGF. Na ekspresiju CTLA-4 proteina utiču brojni genetički faktori, kao što su mutacije ili polimorfizmi na nivou jednog nukleotida. Polimorfizmi na nivou jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) predstavljaju zamjene jednog DNK nukleotida drugim i identifikovani su pri promjeni osjetljivosti na određeno oboljenje, odgovora na terapiju, ishoda oboljenja i sl. Transverzija citozina u timin na poziciji -318 u okviru promotora gena *CTLA4* dovodi do promjene u ekspresiji



Slika 1. Signalna transdukcija pri stimulaciji T-ćelijskog odgovora CD28 i CTLA-4 koreceptorima. Modifikovano prema C. E. Rudd, A. Taylor, H. Schneider, *Immunological Reviews*, 2009. Signalni put CD28 stimuliše produkciju IL-2 (interleukin-2), citokina koji podstiče proliferaciju i diferencijaciju T-ćelija u efektorske i memorijske ćelije. Signalni put CTLA-4 smanjuje produkciju IL-2 i indukuje programiranu ćelijsku smrt (engl. *apoptosis*). Smanjena produkcija stimulatornih citokina dovodi do funkcionalne nereaktivnosti, odnosno anergije (engl. *anergy*) (12).



Slika 2. a) pozicija rs5742909 (-318 C/T) u genu *CTLA4*; b) pretpostavljeni mehanizam kojim polimorfizam na poziciji -318 C/T reguliše ekspresiju *CTLA4* i utiče na pojavu ranih komplikacija, kao što su akutno odbacivanje i odložena funkcija kalema nakon transplantacije bubrega.

CTLA-4 proteina, pri čemu individue koje su nosioci T-alela imaju veću ekspresiju ovog proteina (slika 2) (13). U nekoliko različitih studija pokazana je veza između polimorfizma rs5742909 *CTLA4* gena i povećane incidencije demijelinizovanih lezija kod pacijenata sa multiplom sklerozom (14), povećanom osjetljivošću ka Grejvsovoj bolesti kod pojedinaca sa određenim haplotipom (15) i neželjenim posttransfuzijskim reakcijama (16). U studiji koja je ispitala udruženost ovog SNP sa kliničkim ishodom nakon transplantacije bubrega, TT genotip je pokazao moguću protektivnu ulogu i poboljšanje u dugoročnom preživljavanju alografta (17).

Uprkos brojnim dosadašnjim studijama u vezi sa ishodom bubrežne transplantacije i akutnim odbacivanjem kao pokazateljem uspješnosti, rezultati su vrlo konfliktni (18). Nije pronađena statistički značajna povezanost između velikog broja polimorfizama i akutnog odbacivanja u studiji izučavanja genomske asocijacije (engl. *Genome Wide Association Study*, GWAS) koja je uključila 1528 primalaca transplantiranog organa i 450130 polimorfizama na nivou jednog nukleotida (19). S druge strane, studija koju su sproveli Santjago (*Santiago*) i saradnici (20) ukazuje na moguću protektivnu ulogu *CTLA4* rs3087243 G-alela u slučaju odbacivanja transplantiranog bubrega.

S obzirom na to da je u literaturi do sada slabo ispitana uloga polimorfizma -318C/T (rs5742909) *CTLA4* gena u nastanku ranih komplikacija nakon transplantacije

bubrega, cilj našeg istraživanja bio je da ispitamo moguću povezanost ovog polimorfizma i akutnog odbacivanja kalema, odnosno odložene funkcije kalema kod pacijenata sa transplantiranim bubregom.

Materijal i metode

Ispitanici

Ova retrospektivna kohortna studija je obuhvatila 151 pacijenta Kliničkog centra Srbije koji su u periodu od 1986. do 2013. godine imali transplantaciju bubrega, nakon koje je njihovo stanje praćeno redovnim kontrolama. Studija je rađena u skladu sa kriterijumima Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije. Nakon detaljnog upoznavanja sa ciljem studije, svaki ispitanik je dao dobrovoljni pristanak za učešće. Pacijenti su bili podvrgnuti terapiji kalcineurinskim inhibitorima i preparatima mikofenolične kiseline. Dijagnoza akutnog odbacivanja bubrega je postavljena na osnovu patohistološkog nalaza biopsije bubrega ili na osnovu pogoršanja funkcije kalema koja se oporavlja nakon pulsniha doza glukokortikoida. S obzirom na odsustvo univerzalne definicije za odloženu funkciju kalema, u ovom radu se navedena posttransplantaciona komplikacija definiše kao neophodnost dijalize tokom perioda od dvije postoperativne nedelje. Cjelokupno genetičko istraživanje je izvršeno na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Izolacija DNK

Genetički materijal je izolovan iz uzorka od 5 mL periferne krvi uzete venepunkcijom. Izolacija je izvršena pomoću standardnih kompleta *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Valtem, Masačusets, SAD).

Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu

Lančanom reakcijom polimerizacije u realnom vremenu (engl. *Real time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) uz pomoć komercijalnih *TaqMan* proba (*Thermo Fisher Scientific*, Valtem, Masačusets, SAD) utvrđen je genotip ispitanika. U reakcionoj smješi od 10 µL nalazilo se 5 µL master miksa (2 puta koncentrovanog), 0,25 µL rastvora prajmera (40 puta koncentrovanog), za koje su hemijskim putem vezane fluorescentne boje VIC (za C-alel) i FAM (za T-alel) i 4,75 µL DNK koncentracije 4 ng/mL. Reakcija RT-PCR je obavljena u *Eppendorf Mastercycler realplex2 ep gradient S* aparatu (*Eppendorf*, Hamburg, Njemačka) pod sljedećim uslovima: početna denaturacija 4 min na 95°C, 30 ciklusa sa 15 s denaturacije na 95°C i 1 min elongacije na 60°C. Genotip ispitanika utvrđen je na osnovu analize krive zavisnosti fluorescencije u odnosu na broj ciklusa. Ukoliko je samo fluorescencija porijeklom od boje VIC prešla pragovnu vrijednost genotip ispitanika je CC homozigot, ukoliko fluorescencije obje boje pređu pragovnu vrijednost u pitanju je heterozigot, dok se TT homozigot karakteriše prelaskom pragovne vrijednosti fluorescencije poreklom od FAM boje.

Statistička obrada podataka

Statistička obrada i analiza podataka urađeni su u kompjuterskom programu *Statistical Package for the Social Science SPSS Windows*, verzija 20 (IBM Čikago, Illinois, SAD), a grafičko i tabelarno prikazivanje u programu *Excel Microsoft Office 2013* (Redmond, Vašington, SAD). Pirsonov Hi-kvadrat, Fišerov test tačne vjerovatnoće i Man Vitnijev U-test korišteni su za testiranje statističkih hipoteza sa statističkom značajnošću na nivou od 0,05.

Rezultati

Od 151 ispitanika 92 su muškarci (60,93%), a 59 žene (39,07%). Aritmetička sredina godina starosti iznosi 46,3. Transplantat porijeklom od preminulog donora imalo je 41,06% (62), dok je 58,94% (89) imalo transplantiran organ porijeklom od živog donora. Akutno odbacivanje kalema je imalo 49 pacijenata (32,45%) dok je 41 pacijent (27,15%) ispoljio odloženu funkciju kalema. U našoj kohorti, 129 pacijenata (85,43%) imalo je očuvanu funkciju kalema, dok kod 22 ispitanika presađeni bubrezi nisu bili funkcionalni. U trenutku kada je napravljen presjek studije, dva pacijenta su preminula (1,32%). Daljim ispitivanjem utvrđena je povezanost između DGF i karakteristika presađenog organa, tj. DGF se značajno češće javlja kod pacijenata koji su dobili bubrezi od osobe

Tabela 1. Demografske i kliničke karakteristike 151 pacijenta sa transplantiranim bubregom.

Karakteristike pacijenata	Broj pacijenata	%	AR p	DGF p
Pol				
Muški	92	60,93	0,448	0,715
Ženski	59	39,07		
Davalac				
Živ	89	58,94	0,086	< 0,001
Preminuo	62	41,06		
Akutno odbacivanje				
Da	49	32,45	NP	NP
Ne	102	67,55		
Odložena funkcija kalema				
Da	41	27,15	0,329	NP
Ne	110	72,85		
Status pacijenta				
Živ	149	98,68	0,596	0,468
Preminuo	2	1,32		
Kalem				
Funkcionalan	129	85,43	0,082	0,124
Nefunkcionalan	22	14,57		
Aritmetička sredina ± SD, godine starosti	46,3±11,49		0,802	0,023

SD - standardna devijacija; NP - nije primjenljivo; p - p-vrijednosti su izračunate pomoću Pirsonovog Hi-kvadrat testa ili Fišerovog testa tačne vjerovatnoće, kao i Man-Vitnijevog U-testa; AR - akutno odbacivanje; DGF - odložena funkcija kalema.

koja je preminula ($p < 0,001$), odnos šansi (OŠ) je 0,10, 95% interval povjerenja (95% IP) (0,045 - 0,244) (**tabela 1**). Takođe je utvrđeno da je prosječna starost bolesnika značajno veća u grupi bolesnika sa DGF u odnosu na grupu ispitanika koji nemaju ovu komplikaciju. Za ostale karakteristike, kao što su pol, status pacijenta i funkcija kalema, nije utvrđena udruženost sa AR i DGF.

Lančanom reakcijom polimerizacije u realnom vremenu utvrđen je genotip ispitanika. Rezultati su pokazali da 122 ispitanika ima CC genotip (80,8%), 27 ima CT tip (17,9%) i 2 ispitanika imaju TT genotip (1,3%). Očekivane vrijednosti su podudarne sa dobijenima, te je populacija u ravnoteži prema Hardi-Vajnbergovoj (*Hardy-Weinberg*) formuli (21). Frekvencija C-alela je 89,7%, a T-alela 10,3% (**tabela 2**). Upotrebom statističkih testova ispitana je povezanost učestalosti alela, genotipova i nosilaca polimorfizma i pojavljivanja posttransplantacionih komplikacija. Najveća učestalost C-alela, CC homozigota i C-nosilaca prisutna je u akutnom odbacivanju i u odloženoj funkciji kalema, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na druge pacijente (**tabela 2, 3**).

Najveću učestalost u grupi ispitanika sa odloženom funkcijom kalema imao je CC genotip (73,1% sa DGF, prema 83% bez DGF), zatim CT (24,3% sa DGF, prema 15% bez DGF), a najmanje frekventan je TT genotip (2,4%

sa DGF, prema 1% bez DGF). Distribucija alela C i T kod pacijenata sa odloženom funkcijom kalema je 85% i 15%, a kod ispitanika bez odložene funkcije kalema 91% i 9% (**tabela 3**). U grupi ispitanika sa akutnim odbacivanjem nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova ($p = 0,84$) i alela ($p = 0,98$) u odnosu na grupu koja nema ovu komplikaciju. Grupa pacijenata sa

Tabela 2. Učestalost genotipova, alela i nosilaca alela gena CTLA4 u grupi pacijenata sa transplantiranim bubregom.

CTLA4 gen (rs5742909)		
Genotipovi/aleli/nosioci alela	Broj pacijenata	%
CC	122	80,8
CT	27	17,9
TT	2	1,3
C-alel	271	89,7
T-alel	31	10,3
C-nosioci (CC + CT)	149	83,7
T-nosioci (CT + TT)	29	16,3

odloženom funkcijom kalema takođe nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji genotipova ($p = 0,24$) i alela ($p = 0,12$) u odnosu na grupu bez odložene funkcije kalema (**tabela 3**). Nema statistički značajne razlike u distribuciji nosilaca C-, odnosno T-alela u odnosu na akutno odbacivanje i odloženu funkciju kalema (**tabela 4**).

Diskusija

U ovom radu je ispitivana učestalost polimorfizma -318C/T (rs5742909) u CTLA4 genu, kao i povezanost sa akutnom reakcijom i odloženom funkcijom kalema kod pacijenata sa transplantiranim bubregom. Prethodne studije su pokazale ključnu inhibitornu ulogu CTLA-4 molekula, kao i infekcije, limfocitnu infiltraciju i hipogamaglobulinemiju kao samo neke od mogućih posljedica u slučaju mutacije u okviru CTLA4 gena (22). Rezultati metaanalize, sprovedene 2017. godine, ukazali su na postojanje povezanosti između akutnog odbacivanja i T-alela, samo u afričkoj populaciji (23). Polimorfizam rs5742909 je ispitivan u studiji koju su sproveli Eting (Oetting) i saradnici (24), pri čemu nisu detektovali povezanost ovog polimorfizma sa akutnim odbacivanjem bubrega. Razlike u rezultatima u prethodnim studijama

Tabela 3. Distribucija genotipova i alela grupisanih u odnosu na akutno odbacivanje, odnosno odloženu funkciju kalema.

CTLA4 gen (rs5742909)	Akutno odbacivanje			Odložena funkcija kalema			
	Genotipovi i aleli	da	ne	p^*	da	ne	p^*
CC		40 (0,81)	82 (0,80)		30 (0,731)	92 (0,83)	
CT		8 (0,16)	19 (0,18)		10 (0,243)	17 (0,15)	
TT		1 (0,02)	1 (0,01)	0,84†	1 (0,024)	1 (0,01)	0,24†
C		88 (0,90)	183 (0,90)		70 (0,85)	201 (0,91)	
T		10 (0,10)	21 (0,10)	0,98	12 (0,15)	19 (0,09)	0,12

* p -vrijednosti su izračunate pomoću Pirsonovog Hi-kvadrat testa i † Fišerovog testa tačne vjerovatnoće; vrijednosti su predstavljene kao frekvencije.

Tabela 4. Distribucija nosilaca alela CTLA4 gena u odnosu na pojavljivanje akutnog odbacivanja i odložene funkcije kalema.

CTLA4 gen (rs5742909)	Akutno odbacivanje			p^*	OŠ (95% IP)	Odložena funkcija kalema		p^*	OŠ (95% IP)
	Genotipovi i aleli	da	ne			da	ne		
Nosilac C alela (CC + CT)		48	101		/	40	109	0,470†	/
TT		1	1			1	1		
Nosilac T alela (CT + TT)		9	20	0,856	1,08 (0,45-2,59)	11	18	0,146	0,53 (0,23-1,26)
CC		40	82			30	92		

* p -vrijednosti su izračunate pomoću Pirsonovog Hi-kvadrat testa i † Fišerovog testa tačne vjerovatnoće; vrijednosti su predstavljene kao frekvencije; OŠ - odnos šansi; IP - interval povjerenja.

moгу se pripisati razlici u veličini uzorka i etničkom sastavu ispitivanih populacija. U vezi s tim, relativno mali uzorak i retrospektivna priroda slabosti su naše studije. U našoj studiji smo takođe potvrdili nalaze iz literature da se DGF značajno češće javlja kod pacijenata kojima je bubreг transplantiran od osobe koja je preminula, pri čemu su najznačajniji faktori rizika period hladne ishemije i faza agonije koja je prisutna kod umiruće osobe (25,26). Vrijeme hladne ishemije je period od eksplantacije organa i perfundovanja hladnim rastvorom, do implantacije. Pri odabiru davaoca neophodna je HLA tipizacija, tj. veći stepen nepodudarnosti u kompleksu gena tkivne podudarnosti sa sobom nosi i veći rizik od imunski posredovanog odbacivanja organa. S tim u vezi, bolje HLA sparivanje bi smanjilo potrebu za imunosupresivnom terapijom, pri čemu bi se izbjegla i neželjena dejstva inhibitora kalcineurina (27). Pri biopsiji transplantata porijeklom od preminulog donora dokazani su visoki nivoi ekspresije E-selektina, HLA-DR antigena, intercelularnih adhezivnih molekula (engl. *Intercellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1) i vaskularnih ćelijskih adhezivnih molekula (engl. *Vascular Cellular Adhesion Molecule-1*, VCAM-1), u odnosu na nisku ekspresiju ovih molekula kod transplantata bubrega porijeklom od živog donora. Povećana ekspresija ovih molekula može ukazati na imunski posredovano odbacivanje, samim tim i na nepovoljniji ishod po preživljavanje pacijenta i kalema (28). S obzirom na sve karakteristike sprovedenog istraživanja, neophodno je sprovesti ispitivanje prospektivnog karaktera koje će u obzir uzeti nedostatke dosadašnjih studija i time doprinijeti prevazilaženju diskrepancije u rezultatima.

Zaključak

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna povezanost -318C/T polimorfizma (rs5742909) u genu *CTLA4* i pojave akutnog odbacivanja i odložene funkcije kalema nakon transplantacije bubrega.

Literatura

1. Voora S, Adey DB. Management of kidney transplant recipients by general nephrologists: Core curriculum 2019. American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation. 2019; 73(6):866-79.
2. Fujita T, Kato M, Funahashi Y, Komatsu T, Kinukawa T, Kamihiro O, et al. Factors having effect on graft survival in cadaveric renal transplantation. Transplantation Proceedings. 2014; 46(2):457-9.
3. Kusaka M, Kubota Y, Takahashi H, Sasaki H, Kawai A, Takenaka M, et al. Warm ischemic time as a critical risk factor of graft failure from donors after cardiac death: A single-center experience over three decades in the Kidney Donor Profile Index/Kidney Donor Risk Index era in Japan. International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association. 2019; 26(2):247-52.
4. Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Chudoba P. The influence of warm ischemia elimination on kidney injury during transplantation - clinical and molecular study. Scientific Reports. 2016; 6(1):36118.
5. Naik RH, Shawar SH. Renal Transplantation Rejection. In 2021. StatPearls. StatPearls Publishing.
6. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, et al. A 2018 reference guide to the Banff Classification of renal Allograft Pathology. Transplantation. 2018; 102(11), 1795-814.
7. Alexopoulos E, Leontini M, Daniilidis M. Differentiation between renal allograft rejection and cyclosporine toxicity: a clinicopathological study. American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation. 1991; 18(1):108-15.
8. Bahl D, Haddad Z, Dato A, Qazi YA. Delayed graft function in kidney transplantation. Current Opinion in Organ Transplantation. 2019; 24(1):82-6.
9. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system (5th ed.). Philadelphia, PA: Elsevier - Health Sciences Division. 2015.
10. Esensten JH, Helou Y, A, Chopra G, Weiss A, Bluestone J.A. CD28 costimulation: From mechanism to therapy. Immunity. 2016; 44(5):973-88.
11. Verma N, Burns SO, Walker LSK, Sansom D.M. Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations. Clinical and Experimental Immunology. 2017; 190(1):1-7.
12. Pol JG, Caudana P, Paillet J, Piaggio E, Kroemer G. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. The Journal of Experimental Medicine. 2020; 217(1):jem.20191247.
13. Khan MY, Riaz R, Malik SA, Ali M, Afzal MS. Association of CTLA-4 polymorphisms and autoimmune type-1 diabetes mellitus susceptibility in Pakistani population. Turk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry). 2018; 43(2):173-5.
14. Franssen NL, Crusius JBA, Smolders J. Post-mortem multiple sclerosis lesion pathology is influenced by single nucleotide polymorphisms. Brain Pathology. 2020; 30(1):106-19.
15. Chen X, Hu Z, Liu M, Li H. Correlation between CTLA-4 and CD40 gene polymorphisms and their interaction in graves' disease in a Chinese Han population. BMC Medical Genetics. 2018; 19(1):171.
16. Wen YH, Lin WT, Wang WT, Chiueh TS, Chen DP. Association of CTLA4 gene polymorphism with transfusion reaction after infusion of leukoreduced blood component. Journal of Clinical Medicine. 2019; 8(11):1961.
17. Guo Y, Gao J, Gao S, Shang M, Guo F. Effect of CTLA-4 gene polymorphisms on longterm kidney allograft function in Han Chinese recipients. Oncotarget. 2016; 7(17):23088-95.
18. Dorr CR, Oetting WS, Jacobson PA, Israni AK. Genetics of acute rejection after kidney transplantation. Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation. 2018; 31(3):263-77.
19. Israni A, Dorr C, Miller M, Schladt D, Sanghavi K, Muthusamy A, et al. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Associated With Acute Rejection in European American Kidney Transplant Recipients: A Genome Wide Association Study (GWAS) (abstract) Am J Transplant. 2015.
20. Santiago JL, Sánchez-Pérez L, Pérez-Flores I, de la Higuera MAM, Romero NC, Querol-García J, et al. Association of polymorphisms in T-cell activation costimulatory/inhibitory signal genes with allograft kidney rejection risk. Frontiers in Immunology. 2021; 12:650979.
21. Smith MU, Baldwin JT. Making sense of Hardy-Weinberg equilibrium. The American Biology Teacher. 2015; 77(8), 577-82.
22. Mitsuiki N, Schwab C, Grimbacher B. What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system? Immunological Reviews. 2019; 287(1):33-49.
23. Yang CH, Chen XX, Chen L, Zheng DH, Liu QS, Xie WF, et al. Relationship between cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 -318C/T (rs5742909) gene polymorphism and the risk of acute rejection in renal transplantation. Pediatric Transplantation, 2017; 21(7):e12920.
24. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Lamb KE, Gustafson SK, Samana CJ, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: kidney. Am J Transplant. 2013; 13(1):11-46.

25. Oetting WS, Schladt DP, Dorr CR, Wu B, Guan W, Rimmel RP, et al. Analysis of 75 candidate SNPs associated with acute rejection in kidney transplant recipients: Validation of rs2910164 in MicroRNA MIR146A: Validation of rs2910164 in MicroRNA MIR146A. *Transplantation*. 2019; 103(8):1591–602.
26. Peters-Sengers H, Houtzager JHE, Heemskerk MBA, Idu MM, Minnee RC, Klaasen RW, et al. DCD donor hemodynamics as predictor of outcome after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018; 18(8):1966–76.
27. Manski CF, Tambur AR, Gmeiner M. Predicting kidney transplant outcomes with partial knowledge of HLA mismatch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019; 116(41):20339–45.
28. Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney International*. 1999; 56(4):1551–9.