

# Animalni modeli u transplantaciji bubrega – pogled u budućnost

## Experimental models of kidney transplantation: Possibilities to explore new approaches

Josip Španjol\*, Klara Smolić

Klinika za urologiju, KBC Rijeka, Katedra za urologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

**Sažetak.** Današnja klinička praksa, ali i istraživanja, temelje se na alo(homo)transplantaciji. Najzastupljeniji organ po broju u transplantacijskoj medicini svakako je bubreg. Transplantacija bubrega uvriježen je, najbolji i najekonomičniji način liječenja kronične renalne insuficijencije. Animalni modeli nužni su za istraživanja na području transplantacije organa. Najčešće korištena životinja u istraživanju transplantacije bubrega je štakor. U modernim istraživanjima transplantacije bubrega uvriježila su se dva dobro poznata animalna modela: štakorski model kronične renalne insuficijencije i štakorski model transplantacije bubrega. Za rad i vršenje operacija na eksperimentalnim životinjama istraživač mora posjedovati međunarodni certifikat. Uzgoj, postupci eutanazije, poslijeoperacijske analgezije, razmnožavanja, držanja životinja (nastambe, temperatura, hrana), kao i odlaganja životinjskih leševa i tkiva su visoko standardizirani. Većina današnjih istraživanja, kao i onih koja će se odvijati tijekom sljedećih nekoliko godina, usmjerena su k rješavanju problema oštećenja bubrežnog parenhima transplantata uzrokovanog toplom i hladnom ishemijom. S ciljem izbjegavanja biopsije transplantiranog bubrega istraživanja su i bit će usmjerena k razvoju metoda kontrastnog ultrazvuka u ranoj detekciji reakcije odbacivanja ili k određivanju serumskog markera za akutno odbacivanje transplantiranog bubrega. Također, sve vrste istraživanja bavit će se uzgojem vijabilnih organa za transplantaciju iz matičnih stanica. Iz svega navedenog jasno je kako će različiti animalni modeli transplantacije bubrega imati važnu ulogu u budućim istraživanjima s ciljem povećanja broja transplantacija, kao i produljenja preživljenja transplantiranog organa.

**Ključne riječi:** animalni modeli; imunomodulacija; odbacivanje transplantata; štakorski model; transplantacija bubrega

**Abstract.** Today's clinical practice and research are based on alo- (homo) transplantation. The most common organ used in transplant medicine is certainly the kidney. Kidney transplantation is ingrained, the best and most economical way to treat chronic renal failure. Animal models are necessary for research in the field of organ transplantation. The most commonly used animal in the study of kidney transplantation is a rat. In modern studies of kidney transplantation, we have two well-known animal models: the rat model of chronic renal failure and the rat model of kidney transplantation. To operate on experimental animal's researcher must possess an international certificate. Growing, euthanasia procedures, postoperative analgesia, breeding, animal housing (temperature, food, etc.), as well as the disposal of animal carcasses and tissues are highly standardized. Most of the current researches, as well as those that will take place over the next few years have in focus the damage caused by warm and cold ischemia. To avoid the biopsy of the transplanted kidney studies will be directed towards the development of noninvasive methods for early detection of transplant rejection such as contrast ultrasound or serum markers of acute rejection of the transplanted kidney. In addition, all kinds of investigations will address the cultivation of viable organs for transplantation using stem cells. In conclusion it is clear that different animal models of kidney transplantation will play an important role in future researches in order to increase the number of transplants as well as the prolongation of the survival of transplanted organs.

**Key words:** animal models; immunomodulation; kidney transplantation; rat model; transplant rejection

\*Dopisni autor:

Doc. dr. sc. Josip Španjol, dr. med.  
Klinika za urologiju, KBC Rijeka  
Tome Stričića 3, 51 000 Rijeka  
e-mail: josip.spanjol@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Transplantacija je presađivanje tkiva ili organa na istom živom biću ili između različitih organizama. Možemo je podijeliti prema odnosu davatelja i primatelja na:

- autotransplantaciju – na istom organizmu
- alo(homo)transplantaciju – između dvaju bića iste vrste
- hetero(kseno)transplantaciju – između dviju vrsti.

Današnja klinička praksa, ali i istraživanja, temelje se na alo(homo)transplantaciji. Po broju transplantacija najzastupljeniji organ u transplantacijskoj medicini svakako je bubreg<sup>1-16</sup>.

Bubrezi su parni organi smješteni retroperitonealno. Bubreg odraslog čovjeka teži oko 150 g. Prosječnih je dimenzija 10 – 12 x 5 – 7 x 3 cm. Straga su bubrezi u kontaktu sa stražnjom trbušnom stjenkom, dok se njihovi topografski odnosi razlikuju s prednje strane. Desni bubreg sprijeda je u kontaktu s duodenumom, desnom (hepatalnom) fleksurom kolona i jetrom. Lijevi bubreg sprijeda dodiruju slezena, rep gušterače, želudac i lijeva (lijenalna) fleksura kolona. Krvne žile u bubreg ulaze putem hilusa koji se nalazi na medijalnoj površini bubrega. Gornji pol bubrega prekriven je nadbubrežnom žlijezdom. U bubrežnom hilusu nalazi se i nakapnica (pelvis), a iz nje izlazi ureter. Bubrezi mogu mijenjati položaj s obzirom na disanje i promjenu položaja tijela (ležanje, stajanje). Desni bubreg je zbog pritiska jetre smješten 1 – 2 cm niže od lijevog bubrega. Ovi anatomske odnosi važni su pri eksplantaciji (vađenju bubrega iz tijela darivatelja). Histološki bubreg je egzokrina žlijezda izgrađena od nefrona. Nefron kao funkcionalna jedinica izgrađen je od glomerula, proksimalnog tubula, Henleyjeve petlje i distalnog tubula. Unutar bubrežnog parenhima razlikujemo medulu i korteks. Medulu čine piramide koje pokriva krtek. Vrhovi piramida otvaraju se u male bubrežne čašice (*calices minores*) koje se otvaraju u velike čašice (*calices majores*), a iste u bubrežnu nakapnicu (pelvis). Međusobno komuniciraju vratcima, tj. infundibulumom. Zbog složenosti opisane histološke građe bubreg se presađuje u cijelosti (*in toto*) i jedino tako preuzima funkciju, dok se, primjerice, presaditi može samo dio jetre<sup>2-4</sup>.

## VAŽNOST ANIMALNIH MODELA U ISTRAŽIVANJU TRANSPLANTACIJE BUBREGA

Transplantacija bubrega je uvriježeni, najbolji i najekonomičniji način liječenja kronične renalne insuficijencije. Naime, dijaliza jest samo privremeno rješenje s brojnim nuspojavama i kraćim preživljenjem. U današnje vrijeme prosječno preživljenje transplantiranog bubrega je 5 – 10 godina uz minimalnu imunosupresijsku terapiju. Već

Animalni modeli vrlo su bitni u istraživanju kronične renalne insuficijencije. Većina istraživanja provodi se na štakorskom modelu. Posebno je interesantan štakorski model transplantacije bubrega.

duži niz godina u modernoj kirurgiji i urologiji postoji tendencija intenzivnog uključivanja i primjene animalnih modela u istraživanjima. Urološka istraživanja najčešće imaju za cilj testiranje i usavršavanje novih kirurških tehnika, materijala ili lijekova, ali i razjašnjavanje patogeneze brojnih bolesti i sindroma. Kliničke medicinske grane brzo napreduju, kako pod pritiskom proizvođača medicinske opreme i lijekova, tako i zbog općenite težnje u društvu za svemogućom medicinom i dostizanjem trenutka kada neće postojati neizlječive bolesti. Shodno tome iz dana u dan sve više raste uporaba animalnih modela u svakodnevnoj kliničkoj, istraživačkoj praksi<sup>1-20</sup>.

Animalni modeli nužni su, primjerice, za istraživanja na području transplantacije organa. Transplantacija bubrega je *zlatni standard* u liječenju kroničnog, terminalnog bubrežnog zatajenja. Današnji uspješni postupci i kirurška tehnika u humanoj transplantaciji bubrega rezultat su proširenih istraživanja i eksperimenata na životinjama. Tako je, primjerice, akutno odbacivanje bubrega danas vrlo rijetko upravo zbog dobre imunosupresije usavršene na animalnim modelima. U počecima eksperimentalne kirurgije i urologije uglavnom su se za uvježbavanje i usavršavanje kirurške tehnike koristile velike životinje poput svinje, ovce, psa. No, u današnje vrijeme, vrijeme molekularne biologije, translacijske medicine i genetike, koriste se uglavnom štakori, što zahtijeva primjenu novih mi-

krokirurških tehnika za postizanje sličnih rezultata kao u velikih životinja. Široka primjena životinja u eksperimentalnoj kirurgiji i urologiji skriva mnoge opasnosti od neetičnog postupanja. Kako bi se izbjegla zloropaba te patnja životinja koje sudjeluju u kliničkim istraživanjima svela na minimum, svi istraživački centri imaju posebne etičke odbore koji se bave animalnom etikom te donose jasna i nedvosmislena pravila o držanju, postupanju te žrtvovanju životinja u istraživanju. Također, moraju dati suglasnost na svako planirano istraživanje koje

Većina eksperimentalnih istraživanja bavi se problematikom hladne ishemije i smanjenja reperfuzijskih oštećenja. Također je važna i mogućnost korištenja kontrastnog ultrazvuka u procjeni akutnog oštećenja bubrega uzrokovano akutnim odbacivanjem ili akutnom tubularnom nekrozom.

uključuje žive životinje. Shodno navedenom odgovarajući animalni modeli nužni su u modernim urološkim istraživanjima, a rezultati istih vrlo brzo se implementiraju u svakodnevnu kliničku praksu. Kirurški temelji transplantacije organa postavljeni su početkom 20. stoljeća<sup>1,2</sup>. Iako je bilo mnogo pokušaja transplantacije organa još od antičkoga doba, prvo uspješno eksperimentalno presađivanje organa zabilježeno je početkom prošloga stoljeća<sup>2,3</sup>. Danas je transplantacija organa rutinski postupak, a Hrvatski eksplantacijski i transplantacijski program jedan je od najboljih u svijetu. Emerich Ullmann i Alexis Carrel zaslužni su pioniri transplantacije organa, poglavito bubrega. Oni su neovisno jedan o drugom 1902. godine, prije točno 110 godina, učinili prvu eksperimentalnu transplantaciju bubrega.

Povijesno gledano transplantacija organa u ljudi veže se uz vrlo bizarne eksperimente na životinjama. Valja se prisjetiti eksperimentalne transplantacije u pasa gdje su transplantirane između jedinki, noge, bubrezi, jetra, pokušaji transplantacije glave itd. No u današnje vrijeme uvriježio se štakorski model. Za to postoji nekoliko razloga:

1. uzgoj i razmnožavanje štakorskih sojeva jeftino je i jednostavno,
2. postoji dovoljan broj različitih sojeva,
3. postoji velik broj komercijalnih (jeftinih) anti-tijela za brojne štakorske antigene,

4. otpornost na infekcije,
5. izdržljivosti i visoka stopa preživljenja nakon ekstenzivnih operacija,
6. anatomske strukture u štakora dovoljno su velike da primjenom mikrokirurških tehnika omogućuju kopiranje gotovo svih vrsta operacija koje se rade u ljudi, pa tako i transplantacije bubrega.

Korištenje životinja u eksperimentalnoj kirurgiji i urologiji nekada je bilo bez kontrole, tj. istraživanja su dizajnirana s korištenjem proizvoljnog broja životinja, uzgoj nije bio standardiziran kao ni postupci eutanazije, anestezije i poslijeoperacijske analgezije. Danas to nije tako. Za rad i vršenje operacija na eksperimentalnim životinjama istraživač mora posjedovati međunarodni certifikat. Uzgoj, postupci eutanazije, poslijeoperacijske analgezije, uzgoja, držanja životinja (nastambe, temperatura, hrana), kao i odlaganja životinjskih leševa i tkiva visoko su standardizirani. Većina standarda preuzeta je od Office of Laboratory Animal Welfare, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies i National Research Council of the National Academies iz Sjedinjenih Američkih Država koji su izdali opsežan priručnik pod nazivom *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Sukladno spomenutom priručniku sva istraživanja u kojima se koriste eksperimentalne životinje, moraju biti dizajnirana prema sljedećim osnovnim pravilima i uvjetima:

1. Pravilo triju R:
  - a. **Replacement** (*nadomještanje*) ako je moguće i ako postoji drugi odgovarajući model (npr. stanična kultura) valja izbjeći uporabu eksperimentalnih životinja u istraživanju.
  - b. **Refinement** (*pročišćavanje*) istraživanje mora biti dizajnirano tako da se izbjegne što je više moguće bol i stres u životinja.
  - c. **Reduction** (*smanjenje*) istraživanje mora biti koncipirano tako da se koristi što je manji potreban broj eksperimentalnih životinja, a da rezultat bude znanstveno relevantan.
2. Uvjeti koje mora zadovoljiti istraživanje kako bi u njega mogle biti uključene eksperimentalne životinje su sljedeći:

- a. ne smije postojati alternativa uporabi eksperimentalnih životinja kao što su: *in vitro* modeli, kompjutorske simulacije ili matematički modeli;
- b. očekivani rezultati moraju biti relevantni za ljudsko ili životinjsko zdravlje, moraju unaprijediti sveukupno znanje iz određenog područja istraživanja i moraju biti društveno korisni;
- c. u istraživanju se moraju koristiti životinje odgovarajuće vrste, soja, kvalitete i broja;
- d. istraživanje mora biti osmišljeno tako da se izbjegava, tj. svede na najmanju moguću mjeru neugoda, stres i bol u eksperimentalnih životinja;
- e. korištenje odgovarajuće sedacije, analgezije i anestezije;
- f. postavljanje humanih ciljeva;
- g. dostupnost odgovarajuće veterinarske skrbi;
- h. transport i uzgoj životinja moraju biti povjereni educiranom i certificiranom osoblju;
- i. postupke na živim životinjama mogu isključivo raditi za to kvalificirane i obučene osobe koje posjeduju odgovarajući međunarodni certifikat.

#### NAJČEŠĆE KORIŠTENI ANIMALNI MODELI U MODERNIM ISTRAŽIVANJIMA TRANSPLANTACIJE BUBREGA

U modernim istraživanjima transplantacije bubrega uvriježila su se dva dobro poznata animalna modela: štakorski model kronične renalne insuficijencije i štakorski model transplantacije bubrega.

##### Štakorski model kronične renalne insuficijencije

Radi se o modelu koji imitira pacijenta sa završnim stupnjem kronične renalne insuficijencije (predijalitični pacijenti)<sup>1-3,7</sup>. Kako bi se dobio zadovoljavajući broj životinja s kroničnom renalnom insuficijencijom dovoljno je obraditi 15 – 30 štakora najčešće soja Wistar-Agouti težine između 200 i 250 g. Kako bi se uzrokovala kronična renalna insuficijencija radi se subtotalna nefrektomija u dvije faze.

Po uvođenju životinje u anesteziju pristupa se medijanom laparotomijom na desni bubreg koji se od-

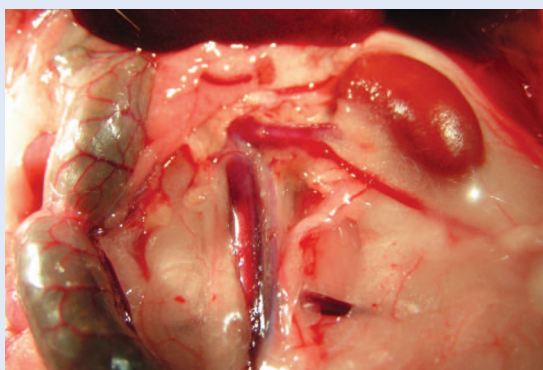
stranjuje, dok se s lijeve strane odstranjuju 2/3 bubrega (resekcija gornjeg i donjeg pola), tako da od ukupne nefronske mase ostaje u organizmu štakora svega 1/6.

##### Štakorski model transplantacije bubrega

Štakorski model transplantacije bubrega najvećim dijelom imitira postupak eksplantacije, pohrane organa i transplantacije u ljudi<sup>1-3,7</sup>. Ako želimo proučavati hladnu ishemiju, tj. učinke raznih prezervacijskih otopina, moramo isključiti imunološku reakciju odbacivanja. To se postiže na jednostavan način, uporabom štakora istog soja za davatelja i primatelja. No, ako želimo proučavati reakciju odbacivanja organa, darivatelj (donator) mora biti štakor jednog soja, dok primatelj mora biti štakor iz drugog soja. Štakori bi trebali biti teški od 250 do 300 g (idealna veličina za izvođenje mikrokirurških zahvata). Za anesteziju se obično koristi ketaminhidroklorid (0, 1 mg/g tjelesne težine intraperitonealno) i ksilazinhidroklorid (0, 02 mg/g na gram tjelesne težine intraperitonealno). Tijekom kirurškog postupka životinje leže na zagrijanoj podlozi kako bi se tjelesna temperatura održavala konstantnom između 36, 5 i 37 °C. Na bubrege davatelja pristupa se medijanom laparotomijom u supinacijskom položaju, moraju se prikazati i supra i infrarenalni odsječci donje šuplje vene i aorte. Potom se suprarenalno u donju šuplju venu i aortu uvode vaskularne kanile te se postavljaju vaskularne klemme na suprarenalni i infrarenalni dio donje šuplje vene i aorte i započinje se s ispiranjem na aortalnu kanilu s *University of Wisconsin solution* (UW) (temperature 4 °C) pod tlakom od 100 mm H<sub>2</sub>O tijekom 3 minute.

Bubrezi se potom vade *en bloc* s vaskularnim pediklima i ureterima te se nakon razdvajanja dodatno ispiru s 5ml UW otopine. Koristi se obično lijevi bubreg zbog duže renalne vene i on se pohranjuje u posebnu posudu ispunjenu UW otopinom na temperaturi od 4 °C tijekom 60 minuta.

Nakon učinjene nefrektomije darivatelj se žrtvuje. U primatelja se pristupa na lijevi bubreg medijanom laparotomijom te se klemaju renalna arterija i vena. Iste se presijeku te se odstrani lijevi bubreg primatelja. Bubreg davatelja postavimo ortotpono na mjesto gdje se nalazio primateljev lijevi bubreg. Vaskularne anastomoze između žila primatelja i bubrega davatelja



Slika 1. Prikaz gornjeg hemiabdomena u štakora



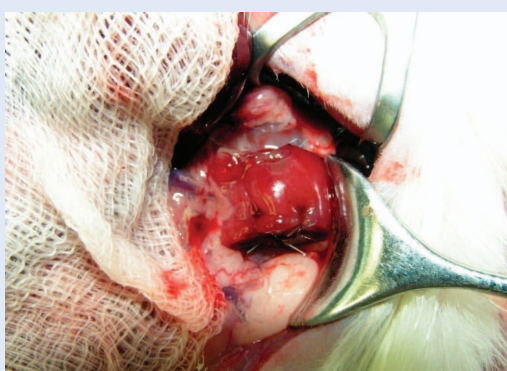
Slika 4. Prikaz lijevog bubrega darivatelja s vidljivom renalnom arterijom i venom te aortom i donjom šupljom venom i ureterom (izdvojen na gazi)



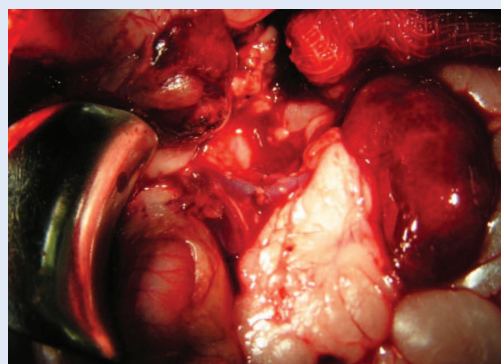
Slika 2. Moderni operacijski stol za mikrokirurgiju malih životinja



Slika 5. Lijevi darivateljev bubreg nakon nefrektomije i ispiranja s kanuliranom venom



Slika 3. Ostatak lijevog bubrega štakora nakon uklanjanja gornjeg i donjeg pola



Slika 6. Lijevi bubreg transplantiran ortotopno nakon puštanja cirkulacije

rade se termino-terminalno (*end-to-end*). Po završetku anastomoza uklanjaju se kleme te se pušta cirkulacija.

Vrijeme hladne ishemije iznosi najmanje 60 minuta, iako može biti i duže, ovisno o tome što se istra-

žuje, a vrijeme tople ishemije iznosi prosječno 35 – 40 minuta. Ako smo zadovoljni s reperfuzijom transplantiranog organa učini se ureterovezikalna anastomoza po Paquinu te se laparotomijska rana sašije po slojevima.

## POGLED U BUDUĆNOST ISTRAŽIVANJA UZ KORIŠTENJE ANIMALNIH MODELA

Većina današnjih istraživanja, kao i onih koja će se odvijati tijekom sljedećih nekoliko godina usmjerena su k rješavanju problema oštećenja bubrežnog parenhima transplantata uzrokovanog toplom i hladnom ishemijom. Naime, u današnjoj kliničkoj praksi većina slučajeva odgođene funkcije transplantiranog bubrega posljedica su akutne tubularne nekroze nastale kao posljedica oštećenja bubrežnog parenhima slobodnim radikalima (oksidativni stres) tijekom reperfuzije (ponovnog uspostavljanja cirkulacije krvi kroz transplantirani organ) nakon transplantacije organa. Reperfuzijsko oštećenje nastaje kao indirektna posljedica hladne (vrijeme pohrane organa u prezervacijskoj tekućini) i tople (vrijeme potrebno za vaskularne anastomoze) ishemije. Traženjem odgovarajuće otopine za prezervaciju organa bavi se nekoliko međunarodnih istraživačkih timova. Zaštita od ishemičnog oštećenja transplantiranog bubrega proučava se upravo na štakorskom modelu. Iako je akutno odbacivanje organa (akutna rejekcija) danas relativno rijetko, ostaje problem njegovog ranog prepoznavanja neinvazivnim metodama. Naime, u kliničkoj praksi se sa sigurnošću može potvrditi odbacivanje jedino „true cut” iglenom biopsijom transplantiranog bubrega. Moramo imati na umu kako biopsija transplantiranog bubrega može imati opasne komplikacije:

- subkapsularni hematoma,
- ruptura transplantiranog bubrega,
- opsežno krvarenje,
- formiranje arterio-venske fistule.

Navedene komplikacije mogu dovesti do trajnog gubitka transplantiranog bubrega. S ciljem izbjegavanja biopsije transplantiranog bubrega istraživanja su i bit će usmjerena k razvoju metoda kontrastnog ultrazvuka u ranoj detekciji reakcije odbacivanja ili k određivanju serumskog markera za akutno odbacivanje transplantiranog bubrega, poput RANKL-a (engl. *Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand*). Početna istraživanja izvode se na štakorskom modelu transplantacije bubrega, dok će se njihov nastavak i priprema kliničke implementacije rezultata dobivenih na animalnom modelu morati raditi na humanom materijalu. U ne tako dalekoj budućnosti (sljede-

ćih 7 – 10 godina) istraživanja vezana za transplantaciju bubrega bit će usmjerena k rješavanju problema kroničnog odbacivanja kako bi se produžio životni vijek transplantata. Rješavanje spomenutog problema iziskivat će sofisticirana istraživanja na molekularnoj razini, korištenjem metoda imunomodulacije:

- maskiranje antigena,
- mijenjanje strukture eksprimiranih antigena,
- mijenjanje cjelokupnog antigenskog fenotipa,
- gašenje pojedinih leukocitnih klonova,
- razvoj imunomodulacijskih cjepiva itd.

Također, sve vrste istraživanja bavit će se uzgojem vijabilnih organa za transplantaciju iz matičnih stanica.

Primjerice, na fibroznom skeletu svinjskog bubrega (očišćen od svih stanica i potencijalnih antigena koji bi mogli izazvati reakciju odbacivanja) kolonizirati će se ljudske matične stanice koje će pod utjecajem različitih organogenetskih čimbenika (npr. BMP-7, engl. *Bone Morphogenetic Protein 7*) stvoriti vijabilni bubreg pogodan za transplantaciju.

Iz svega navedenog jasno je kako će različiti animalni modeli transplantacije bubrega imati važnu ulogu u budućim istraživanjima s ciljem povećanja broja transplantacija, kao i produljenja preživljenja transplantiranog organa<sup>20</sup>.

**Izjava o sukobu interesa:** autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

## LITERATURA

1. Čelić T, Španjol J, Gršković A, Markić D, Prebilić I, Fučkar Ž et al. Bone morphogenetic protein-7 reduces cold ischemic injury in rat kidney. *Transplant Proc* 2011;43: 2505-9.
2. Španjol J, Čelić T, Jakljević T, Ivančić A, Markić D. Surgical technique in the rat model of kidney transplantation. *Collegium Antropologicum* 2011;35(Suppl 2):87-90.
3. Španjol J, Čelić T, Markić D, Đorđević G, Marić I, Fučkar Ž et al. Expression of Receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand in leucocytes during acute kidney rejection after transplantation in rats. *Transplant Proc* 2013;45:1766-70.
4. Mikolašević I, Rački S, Španjol J, Župan Ž, Jakopčić I, Devčić B et al. Outcomes following renal transplantation in older renal transplant recipients: a single-center experience and „Croatian senior program”. *Int Urol Nephrol* 2015;47:1415-22.
5. Luo Y, Shi B, Quian Y, Bai H, Chang J. Sequential monitoring of TIM-3 gene expression in peripheral blood for diagnostic and prognostic evaluation of acute rejection in renal graft recipients. *Transplant Proc* 2011;43: 3669-74.

6. Fahim T, Bohmig GA, Exner M, Huttary N, Kerschner H, Kandutsch S et al. The cellular lesion of humoral rejection: Predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant* 2007; 7:385-93.
7. Zakrzewicz A, Krasteva G, Wilhelm J, Dietrich H, Wilker S, Pabberg W et al. Reduced expression of arrestin beta 2 by graft monocytes during acute rejection of rat kidneys. *Immunobiology* 2011;216:854-61.
8. Sun HJ, Zhou T, Wang Y, Fu YW, Jiang YP, Zhang LH et al. Macrophages and T lymphocytes are the predominant cells in intimal arteritis of resected renal allografts undergoing acute rejection. *Transpl Immunol* 2011;25:42-8.
9. Park HS, Hong YA, Kim HG, Choi SR, Sun IO, Chung BH et al. Delayed graft function in living-donor renal transplantation: 10-Year experience. *Transplant Proc* 2012;44: 43-6.
10. Leguener I, Scoazec JY, Gadot N, Robin N, Pénault-Llorca F, Victorin S et al. Molecular ultrasound imaging using contrast agents targeting endoglin, vascular endothelial growth factor receptor 2 and integrin. *Ultrasound Med Biol* 2015;41:197-207.
11. Liang WX, Cai MJ, Jiang L, Xie YQ, Yuan WL, Zhang H. Ultrasonic imaging characteristics of transplanted kidneys with delayed graft function. *Genet Mol Res* 2014;13:6878-84.
12. Jin Y, Yang C, Wu S, Zhou S, Ji Z, Zhu T et al. A Novel Simple Noninvasive Index to Predict Renal Transplant Acute Rejection by Contrast-Enhanced Ultrasonography. *Transplantation* 2015;99:636-41.
13. Jiang SHT, Karpe KM, Talaulikar GS. Safety and predictors of complications of renal biopsy in the outpatient setting. *Clin Nephrol* 2011;76:464-9.
14. Reinhold SW, Straub RH, Kruger B. Elevated urinary sVCAM-1, IL-6, sIL6R and TNFR 1 concentrations indicate acute kidney transplant rejection in the first 2 weeks after transplantation. *Cytokine* 2012;57:379-88.
15. Solgi G, Furst D, Mytilineos J, Pourmand G, Amirzagar AA. Clinical relevance of pre and post-transplant immune markers in kidney allograft recipients: Anti-HLA and MICA antibodies and serum levels of sCD30 and sMICA. *Transpl Immunol* 2012;26:81-7.
16. Alachkar N. Serum and urinary biomarkers in acute kidney transplant rejection. *Nephrol Ther* 2012;8:13-9.
17. Guide for the Care and Use of laboratory Animals, 8<sup>th</sup> edn, revised. Washington: National Academies Press, 2011.
18. Paquin AJ. Ureterovesical anastomosis: The description and evaluation of a technique. *J Urol* 1959;82:573-83.
19. Wasilewska A, Rybi-Szuminska A, Zoch-Zwierz W. Serum RANKL, osteoprotegerin (OPG), and RANKL/OPG ratio in nephrotic children. *Pediatr Nephrol* 2010;25:2067-75.
20. Španjol J. Eksperimentalni modeli – mogućnost za istraživanje novih pristupa. In: Rukavina D, Rački S (eds). *Transplantacija bubrega u Rijeci – povijesni osvrt i sadašnje stanje*. Rijeka: HAZU, 2016;77-89.