

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Sveučilište u Dubrovniku**  
**Institut Ruđer Bošković u Zagrebu**  
**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij**  
**Molekularne bioznanosti**

Katarina Tomulić Brusich

**ULOGA LIPIDNE PEROKSIDACIJE U MEHANIZMIMA**  
**ODBACIVANJA JETRENOG PRESATKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2021

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Sveučilište u Dubrovniku**  
**Institut Ruđer Bošković u Zagrebu**  
**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij**  
**Molekularne bioznanosti**

Katarina Tomulić Brusich

**ULOGA LIPIDNE PEROKSIDACIJE U MEHANIZMIMA**  
**ODBACIVANJA JETRENOG PRESATKA**

Doktorska disertacija predložena  
Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije  
u svrhu stjecanja doktorata znanosti

Osijek, 2021

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

### ULOGA LIPIDNE PEROKSIDACIJE U MEHANIZMIMA ODBACIVANJA JETRENOG PRESATKA

Katarina Tomulić Brusich

**Disertacija je izrađena u:** KB Merkur, Zagreb i Institutu Ruđer Bošković, Zagreb

**Mentor:** Doc.dr.sc. Ana Čipak Gašparović, viši znanstveni suradnik

**Kratki sažetak doktorske disertacije:** Transplantacija jetre je najuspješnija metoda liječenja bolesnika s ireverzibilnim zatajenjem jetre, a akutno stanično odbacivanje (ASO) predstavlja njenu čestu komplikaciju. Zlatni standard u dijagnostici odbacivanja je biopsija presatka, iako u bolesnika s hepatitisom C može doći do preklapanja patohistološke slike ASO i recidiva virusne bolesti. Jedan od čimbenika koji igra ulogu u patologiji jetre je i oksidacijski stres. U jetrenim biopsijama transplantata detektirane su visoke razine akroleina (ACR) i 4-hidroksinonenala (HNE), što odražava visoku razinu oksidacijskog stresa bolesnika koji pristupaju transplantaciji, ali on ima tendenciju postupnog smanjenja. Nasuprot tome, antioksidacijska zaštita putem NRF2 signalnog puta ostala je konstantno niska. Na sličan način se ACR i HNE ponašaju u biopsijama bolesnika s dokazanim ASO. Predloženi su imunohistokemijski biljezi dodatne potvrde ASO i njegovog razlikovanja od HCV reinfekcije. Rezultati ove studije podupiru ulogu oksidacijskog stresa u patogenezi akutnog staničnog odbacivanja. Stoga, ova studija može pomoći u daljnjim istraživanjima koja će doprinijeti boljoj dijagnostici te olakšati i usmjeriti liječenje u kliničkoj praksi.

**Broj stranica:** 110

**Broj slika:** 25

**Broj tablica:** 16

**Broj literaturnih navoda:** 262

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** transplantacija jetre, akutno stanično odbacivanje, hepatitis C, oksidacijski stres

**Datum obrane:** 28. svibnja 2021. godine

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof.dr.sc. Jerko Barbić, redoviti profesor u trajnom zvanju, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, predsjednik;
2. dr.sc. Lidija Milković, znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, član;
3. dr.sc. Eva Lovrić, znanstvena suradnica, Klinička bolnica Merkur, Zagreb, član;
4. izv.prof.dr.sc. Koraljka Gall-Trošelj, znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, zamjena

**Disertacija je pohranjena u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
University of Dubrovnik  
Ruđer Bošković Institute  
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular  
biosciences

PhD thesis

**Scientific Area:** Interdisciplinary Area of Science  
**Scientific Fields:** Biology and Basic Medical Sciences

### ROLE OF LIPID PEROXIDATION IN MECHANISMS OF LIVER GRAFT REJECTION

Katarina Tomulić Brusich

**Thesis performed at:** University Hospital Merkur, Zagreb and Ruđer Bošković Institute, Zagreb

**Supervisor:** Ana Čipak Gašparović, PhD, Senior Research Associate

**Short abstract:** Liver transplantation is the most successful treatment for patients with irreversible liver failure, and acute cellular rejection is its common complication. Graft biopsy remains gold standard for rejection evaluation, although in patients with hepatitis C, the histopathological features of rejection and recurrence of viral disease may overlap. One of the factors which additionally contributes to liver pathologies is oxidative stress. High levels of acrolein (ACR) and 4-hydroxynonenal (HNE) were detected in liver biopsies, reflecting high levels of oxidative stress in transplant patients, with tendency for gradual decrease. In contrast, antioxidant defence via the NRF2 signalling pathway, remained consistently low. ACR and HNE show similar pattern in biopsies of patients with acute cellular rejection, and are therefore, proposed to be markers for rejection confirmation and as differentiation factor from HCV reinfection. The results of this study support the role of oxidative stress in the pathogenesis of acute cellular rejection. Therefore, this study can help in further research that will facilitate acute cellular rejection diagnosis and direct therapy in clinical practice.

**Number of pages:** 110

**Number of figures:** 25

**Number of tables:** 16

**Number of references:** 262

**Original in:** Croatian

**Key words:** liver transplantation, acute cellular rejection, hepatitis C, oxidative stress

**Date of the thesis defense:** May 28<sup>th</sup>, 2021

#### Reviewers:

1. Jerko Barbić, MD, PhD, Full Professor, Faculty of Medicine, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, commission president;
  2. Lidija Milković, PhD, research associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, member;
  3. Eva Lovrić, PhD, research associate, Clinical Hospital Merkur, Zagreb, member;
  4. Koraljka Gall-Trošelj, MD, PhD, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, substitute
- Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorska disertacija izrađena je u Klinici za kirurgiju KB Merkur, Odjelu za anesteziju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KB Merkur, Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur u Zagrebu i Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom doc.dr.sc. Ane Čipak Gašparović.

*“Do istine možemo doći samo onda ako nam je dana sloboda da grijeshimo”*

*Sir Rabindranath Tagore*

*Ovaj rad posvećujem svojim najdražima*

*- za Paola i Auroru.*

*VELIKU ZAHVALNOST NA POMOĆI U STVARANJU OVOG RADA DUGUJEM:*

- *svojoj mentorici doc.dr.sc. Ani Čipak Gašparović na savjetima i dugogodišnjoj podršci u mojem znanstvenom razvoju*
- *doc.dr.sc. Aniti Škrtić sa Zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur u Zagrebu na stručnoj potpori, izradi i obradi patohistoloških preparata. Također joj se zahvaljujem na prijateljstvu i savjetima u pisanju rada. Bez nje ova disertacija sigurno ne bi ugledala svjetlo dana*
- *djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur u Zagrebu na tehničkoj podršci, prikupljanju i obradi patohistoloških uzoraka*
- *svim članovima Transplantacijskog tima KB Merkur u Zagrebu, pod vodstvom prim. Branislava Kocmana, dr.med., na dugogodišnjoj ugodnoj suradnji i nesebičnoj pomoći u prikupljanju i dokumentiranju podataka potrebnih za izradu rada*
- *prof.dr.sc. Nevenu Žarkoviću na ukazanom povjerenju prilikom pristupanja u Laboratorij za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu*
- *svim djelatnicima Laboratorija za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu na suradnji i pomoći prilikom izrade imunohistokemijskih proba*
- *kolegi dr.sc. Tomislavu Orešiću, dr.med., na ustupljenim protutijelima za izvođenje eksperimentalnog dijela rada*
- *svim članovima Povjerenstva za ocjenu rada*
- *prijateljima čija je podrška pripomogla pisanju rada*
- *Milici Žmire, dr.med., koja je s godinama poznanastva postala puno više od menatora za vrijeme trajanja specijalizacije. Hvala joj na stručnim savjetima, istinskoj brizi i nadasve na nosalomljivoj životnoj filozofiji*
- *svojoj obitelji, suprugu Paolu i kćerki Aurori, koji su uvijek bili uz mene, bez čije potpore, ljubavi i razumijevanja ne bih uspjela*

# SADRŽAJ

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. TRANSPLANTACIJA JETRE .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. IZBOR BOLESNIKA .....	2
1.1.2. DONORI .....	4
1.1.3. INDIKACIJE .....	4
1.1.4. KONTRAINDIKACIJE .....	7
1.1.5. KOMPLIKACIJE .....	7
1.1.6. IMUNOSUPRESIVNO LIJEČENJE .....	8
1.1.7. METODE NADZORA PRESATKA JETRE .....	11
<b>1.2. ODBACIVANJE PRESATKA .....</b>	<b>13</b>
1.2.1. MEHANIZAM ODBACIVANJA .....	14
1.2.2. VRSTE ODBACIVANJA .....	15
1.2.3. KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI ODBACIVANJA .....	17
1.2.3.1. Uloga eozinofila u odbacivanju .....	17
1.2.3.2. Biljezi odbacivanja .....	18
1.2.4. BIOPSIJA JETRE- HISTOPATOLOŠKI NALAZ .....	18
1.2.5. LIJEČENJE ODBACIVANJA .....	21
<b>1.3. VIRUS HEPATITISA C (HCV) .....</b>	<b>22</b>
1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA, DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE HCV-a .....	22
1.3.2. MEHANIZAM IZBJEGAVANJA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA .....	24
1.3.3. PROBLEMI NAKON TRANSPLANTACIJE .....	25
<b>1.4. OKSIDACIJSKI STRES .....</b>	<b>28</b>
1.4.1. BIOLOŠKO DJELOVANJE SLOBODNIH RADIKALA .....	29
1.4.2. LIPIDNA PEROKSIDACIJA I BILJEZI OKSIDACIJSKOG STRESA .....	32



1.4.2.1. AKROLEIN .....	32
1.4.2.2. 4-HIDROKSINONENAL (HNE) .....	33
1.4.3. ANTIOKSIDANSI- OBRANA STANICE OD OKSIDACIJSKOG STRESA .....	34
1.4.3.1. NUCLEAR FACTOR (ERYTHROID-DERIVED 2)-LIKE 2 (NFE2L2 ili NRF2) ....	34
1.4.4. POVEZANOST OKSIDACIJSKOG STRESA I BOLESTI .....	35
1.4.4.1. OKSIDACIJSKI STRES I INFEKCIJA VIRUSOM HEPATITISA C .....	36
1.4.5. OKSIDACIJSKI STRES I TRANSPLANTACIJA JETRE .....	39
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>42</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>43</b>
<b>4. ISPITANICI I METODE .....</b>	<b>44</b>
4.1. ISPITANICI .....	44
4.2. METODE .....	45
4.2.1. STANDARDNE METODE PRIPREME PATOHISTOLOŠKOG PREPARATA .....	46
4.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE I ANALIZA .....	47
4.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....	48
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>50</b>
5.1. ANALIZA OPĆIH PARAMETARA BOLESNIKA KOJIMA JE UČINJENA TRANSPLANTACIJA JETRE .....	50
5.2. ANALIZA OPĆIH KARAKTERISTIKA IZMEĐU SKUPINE S DOKAZANIM ODBACIVANJEM (ASO) I SKUPINE BEZ ODBACIVANJA PRESATKA JETRE (nonASO).....	52
5.3. ANALIZA LABORATORIJSKIH PARAMETARA IZMEĐU SKUPINA ASO I nonASO..	54
5.4. IZRAŽAJNOST AKROLEINA, HNE-a I NRF2 U ODNOSU NA VRIJEME UZIMANJA BIOPSIJA (NULTA vs. INDIKACIJSKA) .....	55
5.4.1. Hepatociti .....	57
5.4.2. Epitel žučnih vodova .....	58
5.4.3. Krvne žile .....	58
5.4.4. Stroma .....	59

5.5. ANALIZA AKROLEINA, HNE-a I NRF2 U ODNOSU NA ODBACIVANJE PRESATKA JETRE (ASO vs. nonASO) .....	60
5.5.1. Hepatociti .....	61
5.5.2. Epitel žučnih vodova .....	62
5.5.3. Krvne žile .....	63
5.5.4. Stroma .....	64
5.6. KORELACIJE IZMEĐU OPĆIH VARIJABLI BOLESNIKA, LABORATORIJSKIH VRIJEDNOSTI I IMUNOHISTOKEMIJSKIH BILJEGA .....	65
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>71</b>
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>84</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>86</b>
<b>9. SAŽETAK .....</b>	<b>103</b>
<b>10. SUMMARY .....</b>	<b>105</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>106</b>
<b>12. POPIS PUBLIKACIJA .....</b>	<b>107</b>

## **POPIS OZNAKA I KRATICA (abecednim redom)**

ACR- akrolein

ALP- alkalna fosfataza

ALT- alanin aminotransferaza

APC- antigen prezentirajuće stanice, od engl. *Antigen-presenting cells*

APTV- aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

ARDS- sindrom akutnog respiracijskog distresa, od engl. *Acute respiratory distress syndrome*

ARE – element aktiviran antioksidansima, engl. *Antioxidant Response Element*

ASO- akutno stanično odbacivanje

AST- aspartat-aminotransferaza

ATP- adenzin-trifosfat

BIS- bolnički informatički sustav

BMI- indeks tjelesne mase, od engl. *Body mass index*

Ca<sup>2+</sup>- kalcij

CD- klaster diferencijacije, od engl. *Cluster of Differentiation*

HCVc- protein jezgre virusa hepatitisa C, od engl. *Hepatitis C virus core protein*

ChE- kolinesteraza

CIT- vrijeme hladne ishemije, od engl. *Cold ischemia time*

Cl<sup>-</sup>- klor

CMV- citomegalovirus

CNI- kalcineurinski inhibitori, od engl. *Calcineurin inhibitors*

COX-2- ciklooksigenaza 2

CRP- C-reaktivni protein

CsA- ciklosporin A

CTLA-4- antigen 4 povezan s aktivnošću citotoksičnih T-limfocita, od engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*

DAB- 3,3'-diaminobenzidin, od engl. *3,3'-diaminobenzidine*

DNA- deoksiribonukleinska kiselina, od engl. *Deoxyribonucleic acid*

DRI- indeks rizika donora, od engl. *Donor Risk Index*

E – eritrociti

EBV- Epstein-Barr virus

Eo - eozinofili

GGT- gama glutamil transferaza

GPx- glutation peroksidaza

GRed- glutation reduktaza

GSH- glutation

HbC- antigen jezgre virusa hepatitisa B, od engl. *Hepatitis B Virus Core Antigen*

HCC- hepatocelularni karcinom, od engl. *Hepatocellular carcinoma*

HCV- hepatitis C virus

HE- Hemalaun-eozin

Hgb- hemoglobin

HIFs- hipoksijom potaknut čimbenik, od engl. *Hypoxia-inducible factors*

HIV- virus humane imunodeficijencije, od engl. *Human immunodeficiency virus*

HLA- humani leukocitni antigen, od engl. *Human leukocyte antigen*

HNE- 4-hidroksinonenal

Htc- hematokrit

IFN- interferon

Ig- imunoglobulin

IL- interleukin

INR- međunarodni normalizirani omjer, od engl. *International Normalized Ratio*

IRO- ishemijsko- reperfuzijska ozljeda

IS- imunosupresija

ISG- gen stimuliran interferonom, od engl. *Interferon-stimulated gene*

K<sup>+</sup>- kalij

KEAP1- ECH-pridruženi protein 1 nalik na Kelch, od engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*

KG- krvna grupa

L- leukociti

LPO- lipidna peroksidacija

LPS- lipopolisaharid

mAB- monoklono protutijelo, od engl. *monoclonal antibody*

MAVS- mitohondijalni antivirusni signalni protein, od engl. *Mitochondria antiviral signaling protein*

MDA- malondialdehid

MELD- model za krajnju fazu bolesti jetre, od engl. *The Model for End-Stage Liver Disease*

Mg<sup>2+</sup>- magnezij

MHC- glavni kompleks tkivne histokompatibilnosti, od engl. *Major Histocompatibility Complex*

MMF- mikofenolat mofetil

MRP- protein odgovoran za otpornost na više lijekova, od engl. *multidrug-resistance protein*

mTOR- meta rapamicina u sisavaca, od engl. *Mammalian Target of Rapamycin*

Na<sup>+</sup>- natrij

NAD- nikotinamid adenin dinukleotid, od engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NADPH- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, od engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NASH- nealkoholni steatohepatitis, od engl. *Non-alcoholic steatohepatitis*

NF- $\kappa$ B- pojačivač kapa lakog lanca nuklearnog faktora aktiviranih B stanica, od engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-ahancer of activated B cells*

NK- prirodne stanice ubojice, od engl. *Natural killer*

NRF2- nuklearni faktor (derivat eritroida 2)-povezan čimbenik 2, od engl. *Nuclear factor (erythroid derived 2)-related factor 2*

PAP- metoda peroksidaza-protuperoksidaza, od engl. *Peroxidase-antiperoxidase method*

PBS- otopina fosfatnog pufera, od engl. *Phosphate buffer solution*

PUFA- polinezasićene masne kiseline, od engl. *Polyunsaturated fatty acids*

PV- protrombinsko vrijeme

RAI- indeks aktivnosti odbacivanja, od engl. *Rejection Activity Index*

RI- indeks otpora, od engl. *Resistention index*

RNA- rinonukleinska kiselina, od engl. *Ribonucleic acid*

ROS- reaktivne kisikove vrste, od engl. *Reactive oxygen species*

SOD- superoksid dismutaza

STAT- protein provoditelj signala i aktivator transkripcije, od engl. *Signal transducer and activator of transcription*

Tac- takrolimus

TBS- Tris-om puferirana fiziološka otopina, od engl. *Tris-buffered saline*

TGF- transformirajući faktor rasta, od engl. *Transforming growth factor*

TLR- receptor sličan Toll-u, od engl. *Toll-like receptor*

Trc- trombociti

Treg- regulatorne T stanice, od engl. *Regulatory T cells*

UCSF- Sveučilište u Kaliforniji u San Franciscu, od engl. *University of California at San Francisco*

UK- Ujedinjeno Kraljevstvo, od engl. *United Kingdom*

VEGF- vaskularno-endotelni čimbenik rasta, od engl. *Vascular endothelial growth factor*

XDH- ksantin-dehidrogenaza

XO- ksantin-oksidaza

WIT- vrijeme tople ishemije, od engl. *Warm ischemia time*

# 1. UVOD

## 1.1. TRANSPLANTACIJA JETRE

Prva transplantacija jetre u ljudi učinjena je ne tako davne 1963. godine. Slijedeća dva desetljeća bila su obilježena raznim poteškoćama: od pronalaska adekvatnih donora, pravovremenim odabirom primatelja, utvrđivanjem optimalnog kirurškog operativnog pristupa i imunosupresivnog liječenja, pa do borbe s infekcijom kao komplikacijom zahvata<sup>1</sup>. Napredak na svakom od ovih polja transformirao je transplantaciju od eksperimentalne metode do standardnog postupka u liječenju završnog stadija bolesti jetre te nekih oblika karcinoma jetre. Trenutno se u svijetu provodi više od stotinu transplantacijskih programa u preko 80 zemalja. Jednogodišnje preživljenje bolesnika prelazi 80% i u stalnom je porastu<sup>2</sup>.

Unatoč tome i danas se transplantacijska medicina susreće s nizom prepreka: velikim nesrazmjerom između broja donora i primatelja te sve češćom potrebom za retransplantacijom; primateljima koji na transplantaciju dolaze s uznapredovalim kroničnim bolestima; posljedicama dugotrajnog liječenja imunosupresivima; porastom incidencije pretilosti te nealkoholnog steatohepatitisa (NASH) kao indikacije za transplantaciju; reinfekcijom presatka virusom hepatitisa C (HCV) i još uvijek nedovoljno poznata biologija ponašanja hepatocelularnog karcinoma<sup>1,2</sup>.

Jetra i srce nisu, za razliku od bubrega i gušterače, a pogotovo tankog crijeva „imunogeni“ organi te se prilikom transplantacije često ne uzima u obzir tkivna podudarnost (HLA tipizacija). Dovoljno je da primatelj i davatelj imaju identičnu ili podudarnu krvnu grupu. Iako je transplantaciju moguće uspješno izvesti i u slučaju kada primatelj i davatelj imaju različite krvne grupe, takve se transplantacije u svijetu iznimno rijetko izvode<sup>3</sup>.

Bolje preživljenje bolesnika nakon transplantacije je povezano s boljom postoperacijskom skrbi te s razvojem selektivnijih imunosupresivnih lijekova, kojima se najčešće sprečava aktivacija T-limfocita<sup>4</sup>. Danas se imunosupresivno liječenje pokušava individualizirati. Primjenjuju se protokoli prilagođeni kliničkom stanju bolesnika, a razvijaju se i nove generacije lijekova s manje neželjenih pojava i toksičnog djelovanja<sup>5</sup>.

Ideal transplantacijske medicine bio bi dostignut kroz postizanje potpune kliničke tolerancije na presadak, koja se definira kao normalno funkcioniranje presatka u potpunom odsustvu imunosupresivnih lijekova. Postoje opisani izdvojeni slučajevi spontanog nastanka tolerancije koji su uzrokovani izvrsnom HLA podudarnošću između donora i primatelja ili postupnim smanjivanjem imunosupresivnih lijekova uslijed nesuradljivosti bolesnika<sup>6</sup>. Međutim, postoje bezbrojna ograničenja za postizanje tolerancije. Kao prvo, tu je naše izrazito slabo poznavanje mehanizama akutnog i kroničnog odbacivanja presatka. Kao drugo, ne zna se koje stanice i signalni putovi sudjeluju u njezinom nastanku, pa stoga još uvijek nije identificiran biljeg koji toleranciju definira<sup>7-9</sup>.



U međuvremenu, na putu do tog ideala, trebali bismo se usredotočiti na otkrivanje mehanizama staničnog odbacivanja presatka jetre, kako bi se došlo do sveobuhvatnog poboljšanja kvalitete i sigurnosti u liječenju bolesnika.

### 1.1.1. IZBOR BOLESNIKA

Transplantacija jetre je etablirana metoda liječenja završnog stadija bolesti jetre (ciroze) kao i akutnog zatajenja jetre. Transplantat jetre može se dobiti sa živog donora i s kadavera<sup>10</sup>. Većina transplantacija danas uključuje kadavera a najčešće se radi o moždano mrtvim donorima, iako je u porastu i broj transplantacija s kardijalno mrtvih donora. Jednogodišnje preživljenje bolesnika nakon transplantacije od kadaveričnih donora je preko 85%, a desetogodišnje preživljenje do 66%<sup>11,12</sup>. Transplantacija sa živog donora pojavila se kao odgovor na manjak organa u zemljama u kojima ne postoji ili nije razvijen donorski program. U Europi on čini samo 4,3% od ukupnog broja transplantacija jetri u odraslih bolesnika<sup>2</sup>.

Bolesnici u terminalnoj fazi bolesti jetre koji ispunjavaju kriterije za transplantaciju jetre prijavljuju se na Nacionalnu listu za transplantaciju jetre. Republika Hrvatska članica je Eurotransplanta<sup>13</sup>, organizacije koja na europskoj razini koordinira i izmjenjuje donirane organe. Procjena mjesta bolesnika na listi izračunava se prema bodovanju MELD (MELD- od engl. *The Model for End-Stage Liver Disease*) i reevaluira svaka tri mjeseca. MELD za cilj ima procjenu kratkoročnog mortaliteta bolesnika s cirozom, na temelju bodovanja tri parametra – ukupni bilirubin, kreatinin i parametar koagulacije izražen kroz INR (INR- od engl. *International Normalized Ratio*)<sup>14</sup>.

$$\text{MELD (broj bodova)} = 10\{0.957 \log(\text{serumski kreatinin}) + 0.378 \log(\text{ukupni bilirubin}) + 1.12 \log(\text{INR}) + 0.643\}$$

Prema predtransplantacijskim bodovima MELD, kandidati za transplantaciju jetre se prema riziku dijele na one s niskim ( $\leq 15$ ), srednjim (16-25) i visokim ( $\geq 25$ ) rizikom smrtnosti<sup>15</sup>. MELD je dobar pokazatelj tromjesečnog preživljenja bolesnika s kroničnom bolesti jetre, neovisno o etiologiji. Naravno, ako bolesnik ima neku pridruženu bolest, koja onemogućava transplantaciju, onda je i procijenjena tromjesečna smrtnost veća (Tablica 1.)<sup>16</sup>.

Tablica 1. Tromjesečni mortalitet procijenjen kroz bodove MELD<sup>16</sup>

MELD	< 9	10-19	20-29	30-39	> 40
Mortalitet samo uz bolest jetre	1.9 %	6.0 %	19.6 %	52.6 %	71.3 %
Mortalitet za bolest jetre i pridruženu bolest	2.9 %	7.7 %	23.5 %	60.2 %	79.3 %

Od siječnja 2016. godine bodovanje MELD se izmijenilo i uključuje i razinu natrija u serumu (tzv. MELD/Na)<sup>17</sup>

$$\text{MELD/Na} = [0.025 \times \text{MELD} \times (140 - \text{Na})] + 140$$

(Napomena: za izmjernu vrijednost natrija u serumu  $\text{Na} < 125$  mmol/L se računa kao 125, a  $\text{Na} > 140$  mmol/l se računa kao 140)

Razlog tome je što izrazita hipo- i/ili hiper natremija znatno utječu na mortalitet bolesnika. Interpretacija MELD/Na bodovanja za tromjesečno preživljenje u potpunosti je ista kao i za MELD (Tablica 2.).

Tablica 2. Interpretacija bodovanja MELD/Na<sup>17</sup>

Bodovi	Mortalitet (%)
MELD/Na >40	71,3
MELD/Na 30-39	52,6
MELD/Na 20-29	19,6
MELD/Na 10-19	6,0
MELD/Na <9	1,9

U bolesnika s hepatocelularnim karcinomom (HCC) bodovanje i stavljanje na listu za transplantaciju radi se prema Milanskim kriterijima. Prema njima, bolesnik s hepatocelularnim karcinomom prilikom stavljanja na listu mora zadovoljiti sljedeće kriterije: veličina jednog izdvojenog tumora  $\leq 50$  mm,  $\leq 3$  tumora od kojih je najveći  $\leq 30$  mm te odsutnost ekstrahepatalnih metastaza i intavaskularne invazije. Neke zemlje (na primjer, Velike Britanije i Sjedinjenih Američkih Država) pokušale su proširenjem Milanskih kriterija omogućiti transplantaciju jetre

za veći broj bolesnika sa HCC-om (UK i UCSF kriteriji)<sup>18,19</sup>, ali obzirom na lošije rezultate ishoda i preživljenja, Milanski kriteriji zasad ostaju zlatni standard.

### 1.1.2. DONORI

Donori organa su bolesnici u kojih je utvrđena moždana smrt, pod uvjetom da je i obitelj pristala na postupak doniranja. Osobitosti donora važan su čimbenik uspješnosti transplantacije i postoperativnog oporavka primatelja. Zbog sve veće potrebe za presacima jetre, kriteriji za izbor donora su se zadnjih godina mijenjali u smislu proširenja istih te danas govorimo o proširenim kriterijima koji uključuju i tzv. marginalne donore. Marginalnim donorima smatraju se osobe starije od 65 godina, s nalazom steatoze u doniranoj jetri većim od 30%, te anti-HBVC (HBVc- od engl. *Hepatitis B Virus Core Antigen*) pozitivni donori<sup>19-22</sup>.

Stratifikacija rizika od strane donora sadržana je u indeksu rizika donora (DRI - od engl. *Donor Risk Index*), koji obuhvaća procjenu sedam karakteristika: dob donora, uzrok smrti, rasu, doniranje nakon srčane smrti, parcijalnu transplantaciju (tzv. split-liver), visinu donora i lokaciju organa. On također obuhvaća i vrijeme hladne ishemije organa (Tablica 3.)<sup>23</sup>, čija duljina nepovoljno utječe na kvalitetu presatka i poslijetransplantacijski tijek. Porast DRI obrnuto je proporcionalan preživljenju presatka i uspješnosti oporavka nakon transplantacije<sup>24</sup>.

### 1.1.3. INDIKACIJE

Ciroza jetre je terminalni i ireverzibilni stadij kronične bolesti jetre. Etiologija ovog poremećaja je raznolika, a kao vodeći uzrok u našoj populaciji navodi se kronična konzumacija alkohola. Slijede infektivni uzročnici, prvenstveno hepatitis B i C te karcinomi (hepatocelularni i kolangiocelularni te izolirane metastaze neuroendokrinih tumora u jetri), kolestatski poremećaji (primarna i sekundarna bilijarna ciroza), toksična oštećenja, sarkoidoza, autoimune bolesti te nepoznati uzroci (kriptogena ciroza) (Tablica 4.)<sup>25-32</sup>.

Tablica 3. Parametri vezani uz izračun DRI, prema Feng i sur.<sup>23</sup>

PARAMETRI	
<b>Dob</b>	<40
	40-49
	50-59
	60-69
	>69
<b>Uzrok smrti</b>	Trauma
	Anoksija
	Cerebrovaskularni incident
	Ostalo
<b>Rasa</b>	Crna
	Bijela
	Ostalo
<b>Donor nakon kardijalne smrti</b>	Da
	Ne
<b>Parcijalni (engl.<i>split</i>) presadak jetre</b>	Da
	Ne
<b>Visina donora</b>	Unijeti visinu u centimetrima
<b>Lokacija organa</b>	Lokalna
	Regionalna
	Nacionalna
<b>Vrijeme hladne ishemije</b>	Unijeti vrijeme u satima
<b>KONAČNI ZBROJ</b>	

Preuzeto s mrežne stranice: <https://gastro.cchmc.org/calculators/donor-risk-index/>

Donor Risk Index for Liver Transplantation Calculator, Cincinnati Children's Hospital Medical Centre

Tablica 4. Indikacije za transplantaciju jetre

STANJE	MOGUĆI UZROCI
<b>Akutno zatajenje jetre</b>	Hepatitis A Autoimuni hepatitis Akutni hepatitis B i C (fulminantni oblik) Kriptogeno zatajenje Wilsonova bolest Budd-Chiari sindrom Lijekovi (npr. paracetamol) Akutna masna infiltracija jetre u trudnoći Reyev sindrom
<b>Ciroza kao posljedica kroničnih bolesti jetre</b>	Kronična infekcija virusom hepatitisa B i C Alkoholna bolest jetre Autoimuni hepatitis Kriptogena bolest jetre Nealkoholni steatohepatitis
<b>Zloćudne bolesti jetre</b>	Hepatocelularni karcinom Metastaze neuroendokrinih tumora u jetri Neuroendokrini tumor gušterače Epiteloidni hemangioendoteliom Kolangiokarcinom
<b>Metaboličke bolesti</b>	Wilsonova bolest Nasljedna hemokromatoza Nedostatak alfa-1 antitripsina Bolesti nakupljanja glikogena Cistična fibroza Crigler-Najjar sindrom Galaktozemija Hiperoksalurija (tip 1) Obiteljska homozigotna hiperkolesterolemija
<b>Vaskularne bolesti</b>	Hemofilija A i B Budd-Chiari sindrom Veno-okluzivne bolesti
<b>Kolestatske bolesti</b>	Sekundarni bilijarni kolangitis Primarni sklerozirajući kolangitis Sekundarna bilijarna ciroza Bilijarna atrezija Alagille sindrom Bylerova bolest
<b>Ostalo</b>	Policistična bolest jetre u odraslih Nodularna regenerativna hiperplazija Carolijeva bolest Amiloidoza Sarkoidoza Teška trauma jetre Težak oblik „graft-versus-host“ bolesti Refrakterni ascites Perzistentni pruritus Kronična jetrena encefalopatija

#### 1.1.4. KONTRAINDIKACIJE

Kontraindikacije za transplantaciju jetre mogu biti apsolutne i relativne. Navedene su u Tablici 5.<sup>33-35</sup>.

Tablica 5. Kontraindikacije za transplantaciju jetre

<b>Apsolutne kontraindikacije</b>	Teška kardiopulmonalna bolest Ekstrahepatalna maligna bolest Aktivna konzumacija alkohola/ droga Akutni alkoholni hepatitis Aktivna infekcija/ sepsa Nedostatak psihosocijalne pomoći Moždana smrt
<b>Relativne kontraindikacije</b>	Uznapredovala dob bolesnika Infekcija virusom HIV Kolangiokarcinom Difuzna tromboza portalne vene

#### 1.1.5. KOMPLIKACIJE

Postoperativni tijek bolesnika nakon transplantacije jetre može varirati od jednostavnog do izrazito kompliciranog. Ishod ovisi o brojnim čimbenicima: o statusu primatelja, čimbenicima donora te o samom tehničkom izvođenju kirurškog zahvata<sup>35</sup>.

Mogu se podijeliti na:

- Primaran izostanak funkcije presatka
- Krvarenje
- Komplikacije vezane za pojedine organske sustave (srčane, plućne, bubrežne, neurološke)
- Vaskularne komplikacije (stenoza ili tromboza jetrene arterije ili portalne vene)
- Infekcije
- Odbacivanje
- Zloćudna oboljenja

Njihovo pravovremeno otkrivanje i liječenje je ključan čimbenik za bolje preživljenje.

### 1.1.6. IMUNOSUPRESIVNO LIJEČENJE

Efektivna imunosupresija označava liječenje koje sprečava odbacivanje presatka od strane imunološkog sustava, te istodobno održava imunološku kontrolu nad nastankom infekcija i neoplazmi<sup>36</sup>. Iako mehanizam nije do kraja razjašnjen, presađak jetre rjeđe se odbacuje u odnosu na druge presađene organe. Transplantirana jetra ne zahtjeva striktnu HLA podudarnost, a može imati i zaštitni učinak na druge organe ako su transplantirani u isto vrijeme<sup>37,38</sup>.

Idealno, dugoročan cilj bila bi uspostava imunološke tolerancije. Drugim riječima, promijeniti imunološki sustav primatelja da održava funkciju presatka bez imunosupresije uz održavanje otpornosti prema infekcijama<sup>39</sup>. Nažalost, samo malom broju bolesnika (~ 20%) je uspješno ukinuta imunosupresija. Većina bolesnika s ukidanjem ovih lijekova doživi epizodu odbacivanja, stoga stalno trebaju bar malu dozu imunosupresiva (IS)<sup>8,40-43</sup>. Najčešće su to inhibitori kalcineurina (CNI- od engl. *calcineurin inhibitors*), antimetaboliti, inhibitori mTOR-a rapamicina u sisavaca (mTOR- od engl. *Mammalian Target of Rapamycin*), kortikosteroidi i protutijela. Svi oni, na različitim mjestima, inhibiraju aktivaciju T-limfocita, što za posljedicu ima izostanak proliferacije T-limfocita i izostanak lučenja citokina koji sudjeluju u procesu odbacivanja.

**Inhibitori kalcineurina:** Ovi lijekovi čine osnovu održavanja imunosupresije. Glavni predstavnici su ciklosporin i takrolimus. Djeluju na način da blokiraju transkripcijske procese u T-limfocitima koji su nužni za stvaranje citokina te na taj način selektivno inhibiraju proliferaciju i aktivaciju T-limfocita.

Ciklosporin se najčešće koristi u transplantaciji srca i pluća. Može se primijeniti samostalno, ali se uobičajeno koristi zajedno s drugim lijekovima (npr. azatioprinom, prednisonom) i tada se primjenjuje u nižoj dozi. Početna doza se nedugo nakon transplantacije smanjuje do doze održavanja. Lijek se metabolizira putem enzima citokrom P-450 3A. Njegova koncentracija u krvi je pod utjecajem brojnih drugih lijekova koji se metaboliziraju na isti način. Najozbiljnija nuspojava je nefrotoksičnost. Ciklosporin uzrokuje vazokonstrikciju aferentnih arteriola s posljedičnom refrakternom hipoperfuzijom glomerula što dovodi do oštećenja glomerularnog aparata i, naposljetku, kroničnog zatajenja bubrega. Osim toga, limfomi B-stanica i poliklonalna proliferacija B-limfocita su češći u bolesnika koji primaju visoke doze ciklosporina ili kombinaciju ciklosporina i drugih imunosupresivnih lijekova usmjerenih protiv T-limfocita, što je vjerojatno povezano s akutnom EBV (*EBV- Epstein-Barr virus*) infekcijom. Ostale neželjene pojave su hepatotoksičnost, refraktorna hipertenzija, povećana incidencija drugih tumora te manje teške popratne pojave kao što su hipertrofija gingive i hirsutizam.

Takrolimus je najčešće korišten lijek kod transplantacije bubrega, jetre, gušterače i crijeva. S primjenom se može započeti u vrijeme transplantacije ili nakon zahvata. Doziranje treba prilagoditi ovisno o koncentraciji lijeka u krvi, koja je pod utjecajem interakcije s istim

lijekovima kao i ciklosporin. Takrolimus može biti koristan u slučajevima kada je ciklosporin neučinkovit ili kad uzrokuje neprihvatljive neželjene učinke. Neželjene pojave takrolimusa su slične onima ciklosporina. Poštedniji je za bubrežnu cirkulaciju od ciklosporina, ali češće izaziva dijabetes i limfoproliferativne poremećaje<sup>44</sup>.

**Inhibitori metabolizma purina:** Najčešće su objedinjeni pod nazivom „antimetaboliti“, budući da svojom kemijskom strukturom nalikuju na osnovne građevne elemente DNA, odnosno na stanične metabolite (purinske i pirimidinske baze, folnu kiselinu). Zbog toga interferiraju s njihovom sintezom i sprečavaju proliferaciju B- i T-limfocita.

Najpoznatiji predstavnici ove skupine lijekova su azatioprin i mikofenolat mofetil.

S primjenom azatioprina započinje se u vrijeme postupka transplantacije. Većina bolesnika ga trajno dobro podnosi. Najozbiljnije neželjene pojave su depresija koštane srži i rijetko hepatitis. Često se koristi zajedno s malim dozama ciklosporina<sup>45</sup>.

Mikofenolat mofetil (MMF), prolijek koji se metabolizira u mikofenolatnu kiselinu, reverzibilno inhibira inozin monofosfat dehidrogenazu, enzim koji je dio puta sinteze gvaninskih nukleotida i bez kojeg nema proliferacije limfocita. MMF se primjenjuje uz ciklosporin i kortikosteroide kod transplantacije bubrega, srca ili jetre. Najčešće nuspojave su leukopenija, mučnina, povraćanje i proljev<sup>46</sup>.

**Rapamicini ili mTOR inhibitori:** Ovi lijekovi blokiraju kinazu mTOR (mTOR - od engl. *Mammalian Target of Rapamycin*), enzim uključen u proces diobe stanica. Njihovo djelovanje dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa i inhibicije odgovora limfocita na stimulaciju citokinima. Svojim mehanizmom djelovanja oni se nadopunjuju s kalcineurinskim inhibitorima. Glavni predstavnici ove skupine su sirolimus i everolimus.

Sirolimus se uglavnom primjenjuje uz ciklosporin i kortikosteroide. Najveću korist od njegove primjene imaju bolesnici sa zatajenjem bubrega, kod kojih se kalcineurinski inhibitor može u potpunosti izostaviti, ili se može nastaviti primjenjivati uz inhibitor mTOR u nižoj, manje toksičnoj dozi. Nuspojave sirolimusa su hiperlipidemija, usporeno cijeljenje rana te supresija koštane srži s leukopenijom, trombocitopenijom i anemijom.

Everolimus se obično primjenjuje u prevenciji odbacivanja transplantiranog srca. Nuspojave su slične kao kod primjene sirolimusa<sup>47</sup>.

**Kortikosteroidi:** Vežu se na glukokortikoidne receptore, koji se nalaze na gotovo svim stanicama. Vežanjem na receptore utječu na sintezu DNA i RNA, inhibiraju sekreciju IL-1 iz makrofaga i IL-2 iz T-limfocita. S njihovom primjenom započinje se u vrijeme transplantacije i to u visokoj dozi, koja se potom postupno smanjuje do doze održavanja. U pojedinih bolesnika može se u potpunosti ukinuti<sup>48</sup>.

**Imunosupresivni Ig (imunoglobulini):** Glavni predstavnici su antilimfocitni globulin (ALG) i antitimocitni globulin (ATG), koji su frakcije životinjskog protuseruma usmjerenog protiv



humanih limfocita odnosno stanica timusa (T- i B-limfociti, plazma stanice). Ova poliklonalna protutijela suprimiraju staničnu imunost. Humoralna imunost ostaje sačuvana. Koriste se zajedno s drugim immunosupresivnim lijekovima, što omogućuje da se potonji primjenjuju u nižim, manje toksičnim dozama. Često se upotrebljavaju u kontroli akutnih epizoda odbacivanja čime se poboljšava stopa preživljenja transplantata. Primjena u vrijeme transplantacije može smanjiti incidenciju odbacivanja čime se odgađa primjena nefrotoksičnog ciklosporina. Primjena visoko pročišćenih serumskih frakcija je u velikoj mjeri smanjila incidenciju nuspojava (npr. anafilaksije, serumske bolesti, glomerulonefritisa potaknutog kompleksom antigen–protutijelo)<sup>49</sup>.

**Monoklonska protutijela (mAB):** usmjerena protiv T-limfocita osiguravaju višu koncentraciju anti-T–staničnih protutijela i nekoliko nevažnih serumskih proteina u odnosu na imunoglobuline (ALG i ATG). S obzirom na mehanizam djelovanja postoje dvije osnovne skupine mAB.

Prva skupina su deplecijska mAB koja dovode do destrukcije limfocita (muromonab-CD3 ili OKT3), dok je druga skupina usmjerena na blokiranje specifičnih mehanizama imunološkog odgovora, bez destrukcije limfocita (nedeplecijska mAB; daklizumab, basiliximab).

Deplecijsko protutijelo miša, mAb OKT3, je trenutno jedino dostupno za kliničku primjenu. OKT3 inhibira vezanje antigena za T-stanični receptor (TCR), s posljedičnom immunosupresijom. Primarno se koristi za kontrolu epizoda akutnog odbacivanja. Može se također koristiti u vrijeme transplantacije kako bi se smanjila incidencija ili odgodila reakcija odbacivanja. Međutim, koristi od profilaktičke primjene se moraju procijeniti u odnosu na nuspojave, koje uključuju tešku infekciju citomegalovirusom (CMV) i stvaranje neutralizirajućih protutijela. Teške nuspojave ograničavaju primjenu OKT3 u pojedinim reakcijama odbacivanja. Prilikom prve primjene, OKT3 se veže za kompleks TCR-CD3, čime aktivira stanicu i potiče otpuštanje citokina, koji uzrokuju vrućicu, rigor, mialgiju, artralgiu, mučninu, povraćanje i proljev. Prethodna primjena kortikosteroida, antipiretika i antihistaminika može ublažiti ove simptome. Reakcija na prvu dozu rjeđe uključuje bol u prsištu, dispneju i bronhospazam, vjerojatno zbog aktivacije komplementa. Ponavljana primjena je povezana s povećanom incidencijom B- staničnih limfoproliferativnih poremećaja potaknutih infekcijom EBV.

Nedeplecijska mAB inhibiraju proliferaciju T-limfocita blokirajući učinak IL-2, kojeg izlučuju aktivirani T-limfociti. Basiliximab i daklizumab se sve više koriste u liječenju akutnog odbacivanja bubrega, jetre i presatka crijeva, ili kao dodatak immunosupresivnom liječenju u vrijeme transplantacije. Jedina poznata nuspojava je anafilaksija. Pojedine studije ukazuju da daklizumab, primjenjen s ciklosporinom, MMF-om i kortikosteroidima povećava stopu smrtnosti. Osim toga, iskustva s protutijelima na receptor IL-2 su ograničena i nije moguće isključiti povećani rizik od pojave limfoproliferativnih bolesti<sup>50</sup>.

Odluka o izboru lijekova ovisi o medicinskoj povijesti bolesti svakog bolesnika ponaosob kao i iskustvu i afinitetima pojedinog centra za transplantaciju (Tablica 6). Većina protokola kombinira lijekove s različitim mehanizmom djelovanja na T-limfocite, kako bi se prilagodila adekvatna doza, a izbjegle nuspojave i razvoj toksičnosti. Trenutno se u većini centara (95%) protokoli temelje na kalcineurinskim inhibitorima (ciklosporin i takrolimus). Njihov glavni

nedostatak je što dugoročno povećavaju rizik od nastanka oštećenja bubrega<sup>51,52</sup>, metaboličkih promjena<sup>17</sup>, neurotoksični su i pogoduju nastanku malignoma *de novo*<sup>53</sup>.

Tablica 6. Najčešći protokol uvođenja imunosupresivnih lijekova pri transplantaciji jetre

<b>1.</b>	<b>KALCINEURINSKI INHIBITORI</b> - ciklosporin A (Neoral, Sandimmune) - takrolimus (Prograf, Advagraf)	i/ili	<b>mTOR INHIBITORI</b> - sirolimus (Rapamune) - everolimus (Afinitor, Zortress)
<b>2.</b>	<b>ANTIMETABOLITI</b> - natrij mikofenolat ili mikofenolat mofetil (Cell Cept, Myfortic) - azatioprim (Imuran)		
<b>3.</b>	<b>KORTIKOSTEROIDI</b> - prednisolon (Solu Medrol, Decortin)		

Zbog tog razloga razvijaju se protokoli i agensi koji bi selektivno inducirali toleranciju transplantata na specifični antigen, a da pri tome ne suprimiraju druge aspekte imunološkog odgovora. Za sada su se dvije strategije pokazale obećavajućima: 1) Blokada T-staničnih kostimulacijskih putova primjenom citotoksičnog T-limfocitom udruženog antigena 4 (CTLA-4; od engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) i fuzijskog proteina IgG1<sup>54</sup>; 2) Indukcija kimerizma (koegzistencija imunoloških stanica primatelja i davatelja pri čemu se stanice transplantata prepoznaju kao vlastite) primjenom nemijeloablacijskog predtransplantacijskog liječenja (npr. ciklofosamid, zračenje timusa, ATG i ciklosporin) koje uzrokuje prolazni nestanak T-limfocita, usađivanje matičnih hematopoetskih stanica davatelja s posljedičnim nastankom tolerancije na solidni organ istog davatelja<sup>55</sup>.

### 1.1.7. METODE NADZORA PRESATKA JETRE

Procjena funkcije presatka jetre započinje za vrijeme transplantacije. Ono uključuje makroskopski izgled reperfundirane jetre, boju, konzistenciju, te sposobnost nove jetre da regulira glikemiju, metabolizam laktata i nastanak CO<sub>2</sub>, procjenu kvalitete i količine žuči te porast tjelesne temperature. Edem presatka, neuobičajena boja, nenormalno stvaranje CO<sub>2</sub>, oligoanurija, nemogućnost povišavanja tjelesne temperature, hemodinamska nestabilnost te abnormalnosti u koncentraciji glukoze, laktata i kalija u serumu, sve su to znakovi neadekvatne funkcije presatka<sup>56,57</sup>.

Nakon završetka operacijskog zahvata nadzor se kontinuirano nastavlja u Jedinici intenzivnog liječenja (JIL). Ono se sastoji od laboratorijskih parametara, ultrazvučnog praćenja presatka i eventualne biopsije jetre ovisno o indikaciji (prema kliničkom stanju bolesnika i pojedinim laboratorijskim parametrima).

Za laboratorijsku analizu uzimaju se kompletna krvna slika: leukociti (L), eritrociti (E), hemoglobin (Hgb), hematokrit (Htc), trombociti (Trc), eozinofili (Eo), analize plinova i acidibazni status, koagulacijski profil: protrombinsko vrijeme (PV), internacionalni omjer protrombinskog vremena (INR), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV), fibrinogen, te biokemijska analiza seruma: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, urea, kreatinin, glukoza, ukupni i direktni bilirubin, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), gama glutamil transferaza (GGT), alkalna fosfataza (ALP), C-reaktivni protein (CRP), laktati.

Porast vrijednosti transaminaza (AST i ALT) upućuje na oštećenje hepatocita, dok povišene vrijednosti ALP i GGT upozoravaju na oštećenje stanica žučnih kanalića i kolestazu. Koagulacijski parametri (PV), kolinesteraza (ChE) i kolesterol odražavaju sintetsku funkciju hepatocita dok bilirubin i laktati ukazuju na njihovu aktivnost u detoksikaciji.

Biokemijski funkcionalni testovi jetre imaju široku primjenu u kliničkoj medicini. Služe za neinvazivnu dijagnostiku te u nadzoru liječenja bolesti jetre. Međutim, nisu specifični i dovoljno osjetljivi za otkrivanje akutnog odbacivanja, i ne koreliraju s njegovom težinom<sup>58,59</sup>.

Značajan dio poslijetransplantacijske evaluacije čini još jedna neinvazivna metoda, koja rano i jednostavno uz krevet bolesnika može upozoriti na razne komplikacije, To je ultrazvuk presatka jetre upotrebom obojenog Dopplera. Ultrazvuk pokazuje strukturu i gustoću parenhima, prohodnost vaskularnih anastomoza, širinu velikih žučnih putova te eventualne tekuće intraabdominalne kolekcije upućujući na postojanje ascitesa, biloma ili hematoma pa i na unutarnje abdominalno krvarenje<sup>60-63</sup>. Kao pomoć u procjeni propusnosti krvožilnih anastomoza služi indeks rezistencije (RI – od engl. *Resistention Index*). Niski indeks viđa se u stenozu ili trombozi jetrene arterije, što se dodatno potvrđuje angiografijom. Vrlo nizak RI udružen s naglim porastom transaminaza jetre i lošom sintetskom funkcijom presatka upućuje na njegovu primarnu nefunkcionalnost. Sumnja na nekrozu ili odbacivanje potvrđuje se histološkim pregledom bioptičkog materijala<sup>64</sup>.

Histološka procjena igra važnu ulogu u dijagnostici i nadzoru disfunkcije presatka jetre. Indikacije za biopsiju jetre uključuju abnormalne vrijednosti transaminaza jetre, bilo zbog porasta u odnosu na početne vrijednosti, bilo zbog izostanka normalizacije nakon transplantacije. Osim toga, mnogi centri provode protokolarne biopsije u unaprijed zadanom vremenskom periodu, bez obzira na razinu transaminaza<sup>65</sup>.

Spektar bolesti koji se javljaju u posttransplantacijskoj patologiji jetre je širok i može se podijeliti u tri osnovne kategorije<sup>66</sup>:

- Novonastale (*de novo*) abnormalnosti nakon transplantacije (najčešće prouzrokovane kirurškim komplikacijama, čimbenicima vezanim uz donora, ishemijsko-reperfuzijske ozljede, tromboze jetrene arterije i slično)
- Ponovna pojava osnovne bolesti (primarni sklerozirajući hepatitis, reinfekcija virusom hepatitisa C)
- Odbacivanje (akutno i kronično).

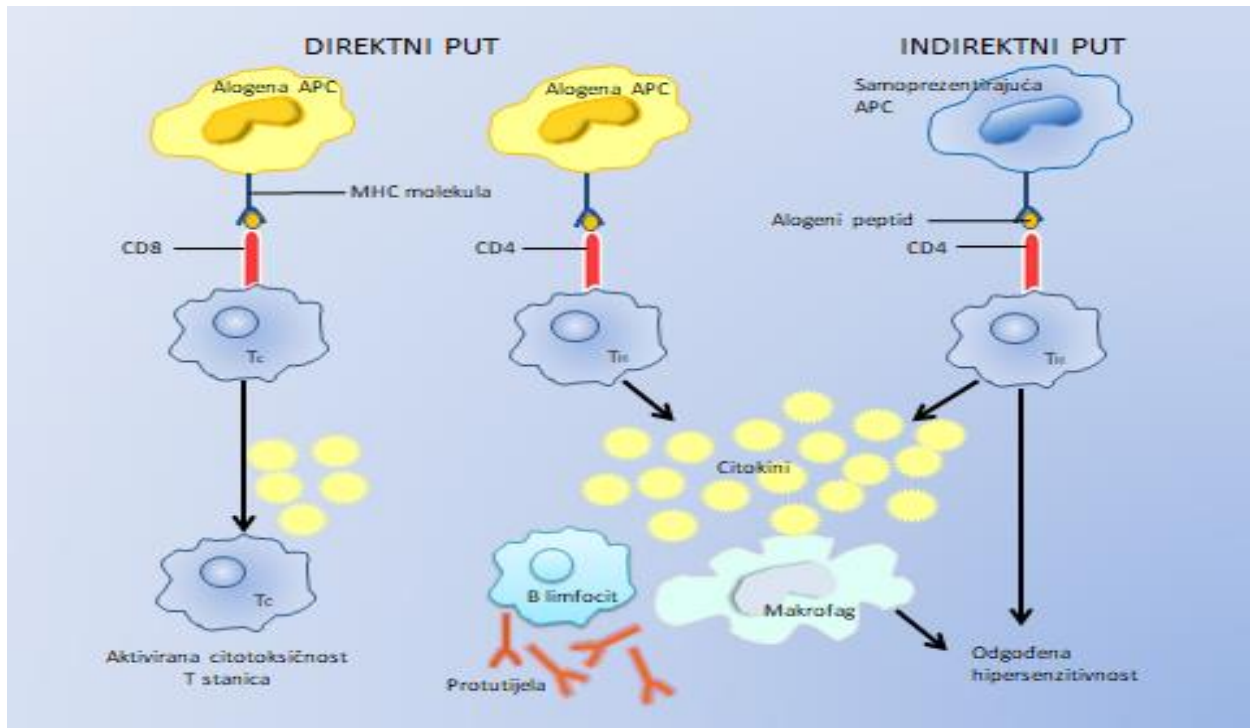
Biopsija jetre ostaje zlatni standard za dijagnostiku akutnog i kroničnog odbacivanja<sup>67</sup>. Većina centara koristi međunarodno prihvaćene kriterije Banff za dijagnozu i procjenu ovih entiteta, o čemu će biti više riječi u poglavlju o odbacivanju<sup>68,69</sup>.

Trenutno, imunosupresija se može pratiti preko razine kalcineurinskih inhibitora u krvi (ciklosporin i takrolimus). Međutim, njihovo doziranje i ciljne koncentracije variraju od centra do centra<sup>70-72</sup>. Isto tako, kalcineurinski inhibitori imaju veliku farmakokinetičku varijabilnost te je teško predvidjeti koncentraciju koja se može postići davanjem ili izostavljanjem određene doze lijeka<sup>73</sup>. U nekih bolesnika niska razina lijeka može uzrokovati odbacivanje presatka, dok kod nekih bolesnika može imati toksične učinke. Do danas nije nađena korelacija između izmjerene koncentracije lijeka u krvi, odbacivanja i dugoročnog preživljenja presatka<sup>74</sup>.

## 1.2. ODBACIVANJE PRESATKA

Odbacivanje presatka događa se kao rezultat humoralnog (posredovanog protutijelima) i celularnog (staničnog) odgovora od strane primatelja na specifične antigene prisutne u tkivu donora. Ti antigeni su poznati kao glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC- od engl. *Major Histocompatibility Complex*). U ljudi je ova skupina molekula nazvana humani leukocitni antigen (HLA- od engl. *Human Leukocyte Antigen*) i nalazi se na kratkom kraku kromosoma 6p.

Molekule MHC podijeljene su u dvije klase. Klasa I molekula obično je izražena na svim stanicama s jezgrom, dok je klasa II izražena samo na specijaliziranim antigen-prezentirajućim stanicama (APC- od engl. *Antigen-Presenting Cells*), kao što su dendritičke stanice, makrofagi i aktivirani B-limfociti. Fiziološka funkcija MHC- molekula je prezentacija antigenskih peptida T-limfocitima, koji mogu prepoznati antigen samo kada je u kompleksu s MHC- molekulom. Molekule MHC klase I odgovorne su za predstavljanje antigenskih peptida iz stanice (npr. antigena unutarstaničnih virusa, tumorskih antigena) CD8+ T-limfocitima. Klasa II molekula prezentira izvanstanične antigene (npr. izvanstanične bakterije) CD4+ T-limfocitima (Slika 1.)<sup>75</sup>.



Slika 1. Osnovna struktura i funkcija MHC molekula. Prilagođeno prema izvoru: Clarkson MR i sur.<sup>76</sup>

### 1.2.1. MEHANIZMI ODBACIVANJA

Imunološki odgovor na transplantirani organ sastoji se i od staničnog (posredovanog limfocitima) i od humoralnog (posredovanog protutijelima) mehanizma. Iako su i ostale vrste stanica uključene u odbacivanje, T-limfociti su središnje stanice u odbacivanju presatka. Reakcija odbacivanja sastoji se od dvije faze: senzibilizacije i efektorne faze.

**Faza senzibilizacije:** U ovoj fazi CD4+ i CD8+ T-limfociti preko svojih receptora prepoznaju aloantigene izražene na stanicama stranog presatka. Potrebna su dva signala za prepoznavanje antigena. Prvi osigurava interakciju receptora T-limfocita sa antigenom koji su mu prezentirale MHC molekule, a drugi osigurava interakciju kostimulativnih receptora (CD28+) s antigen prezentirajućim stanicama<sup>76</sup>.

**Efektorna faza:** Brojni neimunološki mehanizmi doprinose odbacivanju presatka. Ozljeda tkiva ili ishemija izazivaju nespecifičnu upalnu reakciju, a samim time i porast kemokina i citokina koji dodatno dovode do ekspresije MHC klase II. To u konačnici ima za posljedicu povećanu prezentaciju antigena T-limfocitima. Nakon aktivacije, CD4+ T-limfociti pokreću razvoj hipersenzitivnosti preko makrofaga i pomažu produkciju protutijela preko B-limfocita. Aktivirani CD8+ T-limfociti pokreću stanično posredovanu citotoksičnost ili, alternativno, apoptozu<sup>77</sup>.

Važnu ulogu u akutnom i kroničnom odbacivanju solidnih organa čine i NK-stanice (NK- od engl. *natural killer*; „stanice prirodne ubojice“) koje imaju sposobnost samostalnog prepoznavanja stranih antigena (aloantigena), bez da su im oni prezentirani preko MHC molekula. Imaju izrazito jak efektorni mehanizam i mogu izazvati uništenje stanica i apoptozu. Nedavna istraživanja pokazala su da se NK-stanice aktiviraju odmah nakon infiltracije u presadak. Isto tako, bolesnici koji imaju imunoglobulinske receptore slične NK-stanicama imaju manji rizik od nastanka odbacivanja, zbog toga što oni inhibiraju donorske MHC molekule<sup>78</sup>.

Iako T-limfociti imaju ključnu ulogu u akutnom odbacivanju, pojačano stvaranje proupalnih medijatora u presatku se pojavljuje prije odgovora T-limfocita. Ovaj oblik upalnog odgovora pojavljuje se vrlo rano nakon transplantacije organa i odvija se preko urođenog imunološkog odgovora. Glavnina odgovora odvija se preko Toll-like receptora (TLR). Mehanizam urođene imunosti nije dovoljno jak da samostalno izazove odbacivanje. Međutim, ima veliku ulogu u adaptaciji organizma na presadak i može imati veliku ulogu u sprečavanju nastanka tolerancije na presadak<sup>79</sup>.

### 1.2.2. VRSTE ODBACIVANJA

S obzirom na brzinu nastanka odbacivanja dijele se na: hiperakutne, akutne i kronične.

1. Hiperakutno odbacivanje: Javlja se obično unutar prva 24 sata nakon transplantacije. Dobar primjer je odbacivanje presatka jako prokrvljenih organa (npr. bubrega i srca) zbog nepodudarnosti krvnih grupa. Izrazito rijetko se događa zbog univerzalno prihvaćenog pretransplantacijskog unakrsnog probira (tzv. cross-match) kojim se utvrđuje krvna grupa i provodi HLA- tipizacija primatelja i davatelja te se utvrđuje preosjetljivost primatelja na antigene davatelja. Ovaj odgovor se događa tako brzo da tkivo gotovo nikada ne bude prokrvljeno. Karakteriziraju ga tromboze velikih krvnih žila u presatku i krvarenja u okolno tkivo, koja počinju unutar par minuta do par sati nakon transplantacije. Uzrokovano je prethodno postojećim protutijelima domaćina koja se vežu na antigene u endotelu presatka (humoralno odbacivanje). Prepoznavanje antigena aktivira sustav komplementa i priljev neutrofila. Molekule lipida iz endotela i trombocita potiču koagulaciju i upalne promjene koji u konačnici dovode do ozljede tkiva uslijed ishemije i mikrovaskularne tromboze<sup>80</sup>. Bubrež je najosjetljiviji na hiperakutno odbacivanje<sup>81</sup>. Smanjena osjetljivost jetre na ovaj tip odbacivanja objašnjava se djelovanjem Kupfferovih stanica i samog presatka. Kupfferove stanice imaju sposobnost fagocitiranja imunih kompleksa, što sprječava upalnu reakciju. Presadak jetre izlučuje topljive MHC-I antigene koji se vežu na MHC-I protutijela i neutraliziraju ih<sup>82-84</sup>.
2. Akutno odbacivanje: Najčešće počinje unutar prvog tjedna od transplantacije, u 15-25% bolesnika<sup>85</sup>. Nastaje zbog nepodudarnosti u antigenima HLA. Ovi su antigeni polimorfni, i stoga je vjerojatnost za savršeno preklapanje donora i primatelja izuzetno mala<sup>86</sup>. Akutno

odbacivanje odvija se posredovanjem T-limfocita. Proces odbacivanja počinje njihovom diferencijacijom, koja rezultira stvaranjem protutijela, za što je potrebno približno tjedan dana. T-limfociti dovode do razgradnje stanica presatka ili luče citokine koji privlače druge upalne stanice. Posljedica je nekroza tkiva. Najprije stradaju endotelne stanice dobro prokrvljenog tkiva. U jetri primarno zahvaća interlobularne žučne vodove i vaskularni endotel, ponajviše portalne i hepatalne vene, a rijetko hepatalne arterije i njene ogranke<sup>87</sup>. Rizik od akutnog odbacivanja najviši je u prvih tri mjeseca nakon transplantacije, a snižava ga imunosupresivno liječenje u dozi održavanja<sup>88,89</sup>. Rano akutno odbacivanje liječi se jednokratnim visokim dozama kortikosteroida. Ove epizode odbacivanja ne utječu toliko negativno na sam presadak niti na ishod bolesti, osim u bolesnika s virusom hepatitisa C. U njih je ishod nešto lošiji zbog toga što steroidi pogoduju pojačanoj replikaciji virusa<sup>90</sup>.

3. Kronično odbacivanje: Javlja se nakon par mjeseci ili par godina nakon transplantacije. Može biti posredovano i protutijelima (humoralno) i/ili stanicama (celularno). Njegova prevalencija (prema protokolarnim biopsijama) varira između 5% nakon prve godine pa do 20% nakon pet godina od transplantacije. Kronično odbacivanje karakterizira začepljenje arterija presatka, koje je posljedica proliferacije glatkih mišićnih stanica i proizvodnje kolagena od strane fibroblasta. Ova ubrzana ateroskleroza dovodi do fibroze presatka, ishemije i smrti stanica. Specifična histopatološka slika ovisi o transplantiranom organu. Kod transplantacije srca se kronično odbacivanje manifestira kao ubrzana ateroskleroza koronarnih arterija; kod pluća kao obliterirajući bronhiolitis; kod bubrega kao fibroza i glomerulopatija; a kod jetre kao sindrom nestajanja žučnih vodova<sup>91</sup>. U patohistološkom preparatu odbačenog tkiva jetre najčešće su zahvaćeni portalni tračci, perivenularne regije i arterije. Za postavljanje točne dijagnoze najkorisniji su parametri promjene na epitelnim stanicama žučnih vodova, oštećenje i gubitak žučnih vodova, i perivenularna fibroza.

Fibrozne lezije nastaju bez očitog drugog uzroka (vaskularna ozljeda ili infekcija). Pretpostavlja se da je kronično odbacivanje u stvari rezultat kontinuiranog produženog niza epizoda akutnog odbacivanja. Ta hipoteza se temelji na spoznaji da je fibroza presatka slična fibrozi koja prati prirodno zacjeljivanje rana<sup>92-94</sup>.

Slijedeći čimbenici povećavaju rizik od kroničnih odbacivanja<sup>95</sup>:

- Prethodna epizoda akutnog odbacivanja
- Neadekvatna imunosupresija
- Početno odođena funkcija presatka
- Čimbenici povezani s donatorom (npr. dob, hipertenzija)
- Reperfuzijska ozljeda organa

- Dugo vrijeme hladne ishemije
- Čimbenici povezani s primateljem (npr. dijabetes, hipertenzija, hiperlipidemija)
- Posttransplantacijske infekcije (npr. citomegalovirus).

Većina primatelja mora uzimati imunosupresivne lijekove cijeli život, iako niti to nije garancija da neće doći do kroničnog odbacivanja i zatajenja presatka. Sve to dovodi do povećane potrebe za retransplantacijom. Stoga je ključno rano identificirati primatelje koji će imati najviše koristi od tog postupka<sup>96,97</sup>.

### **1.2.3. KLINIČKI I LABORATORIJSKI PARAMETRI ODBACIVANJA**

Nakon svake transplantacije dolazi do imunološke aktivacije u organizmu primatelja. Međutim, samo kod manjeg broja bolesnika dolazi i do kliničkog manifestiranja odbacivanja. Akutnu reakciju odbacivanja mogu pratiti i simptomi slični infekcijama gornjih dišnih putova. Porast tjelesne temperature nespecifičan je znak koji može biti također posljedica infekcije, atelektaze pluća i/ili reakcije na imunosupresivno liječenje. Reakcija odbacivanja uzrokuje akutno, najčešće asimptomatsko pogoršanje funkcije presatka jetre. Ono može biti praćeno porastom vrijednosti bilirubina i transaminaza i pogoršanjem sintetske funkcije u vidu niskih vrijednosti PV-a, albumina i ChE<sup>85</sup>.

Većina rutinskih testova (npr. određivanje vrijednosti transaminaza, PV-a, albumina, ChE) koji se koriste u procjeni presatka jetre su pojedinačno nespecifični. Međutim, njihova kombinacija povećava dijagnostičku učinkovitost. Korisni su jer mogu otkriti prisutnost problema, ali nažalost ne i sam problem. Moraju se interpretirati u kontekstu kliničke slike bolesnika<sup>98</sup>.

#### **1.2.3.1. Uloga eozinofila u odbacivanju**

U posljednjem desetljeću postoji sve veći broj studija koji naglašava ulogu eozinofila u akutnom odbacivanju, bilo da se oni nalaze u perifernoj krvi, bilo u samom presatku jetre. Postoji značajan porast postotka eozinofila u presatku za vrijeme odbacivanja, razmjerno onom u perifernoj krvi. To bi značilo da eozinofili aktivno sudjeluju u postupku odbacivanja, a ne da samo migriraju<sup>99,100</sup>. Isto tako, brza pojava eozinofila (unutar 2-4 dana) nakon liječenja epizode odbacivanja pokazatelj je lošije prognoze u odnosu na preživljenje presatka<sup>101</sup>. Točna uloga eozinofila u dijagnosticiranju i predviđanju odgovora na liječenje odbacivanja tek mora biti dokazana.



### 1.2.3.2. Biljezi odbacivanja

Razni biljezi su analizirani kako bi se identificirao biljeg specifičan za odbacivanje ili toleranciju, nakon transplantacije jetre. Uglavnom su analizirani pro-upalni i imunoregulatorni citokini te drugi proteini povezani s upalom. Međutim, većina njih nije specifična za akutno odbacivanje. Samo je nekoliko biljega validirano, uglavnom na analizi uzoraka periferne krvi, u kojoj NK stanične molekule najviše obećavaju, dok se uloga CD4 + CD25 + Foxp3 + T-limfocita mora dodatno definirati. Do danas je jedino Cylex ImmuKnow Assay komercijalno dostupan test za procjenu imunološkog statusa transplantiranih bolesnika<sup>102,103</sup>. Njime se kvantificira adenozin trifosfat proizveden u CD4 + T- stanicama nakon stimulacije donor nespecifičnim mitogenom *in vitro*. Još uvijek se ne primjenjuje u širokoj kliničkoj praksi.

### 1.2.4. BIOPSIJA JETRE- HISTOPATOLOŠKI NALAZ

U većini slučajeva, biopsija se izvodi zbog promjene u razini enzima jetre (abnormalnosti u jednoj ili više funkcija jetre), zbog promjena uočenih slikovnim metodama (ultrazvuk), za praćenje nalaza u odnosu na ranije biopsije ili kao dio protokola u nekim centrima za transplantaciju. Godine 1997. je za određivanje akutnog staničnog odbacivanja klasifikacija Banff postala široko prihvaćena (Tablica 7.). Usvajanje ovog standardiziranog patohistološkog sustava pomaže u utvrđivanju stadija odbacivanja i predviđanja potrebe za dodatnim liječenjem protiv odbacivanja<sup>104</sup>.

Akutno odbacivanje mikroskopski je obilježeno: 1) predominantno mononuklearnim, ali miješanim upalnim infiltratom koji sadrži i blastične ili aktivirane limfocite, neutrofile i eozinofile, 2) subendotelnom upalom portalne i/ili terminalnih hepatalnih venula, i 3) upalom i oštećenjem žučnih vodova. Za postavljanje dijagnoze potrebno je da uzorak sadrži minimalno dva navedena obilježja. U prilog akutnome odbacivanju ide i oštećenje više od 50% žučnih vodova ili centralnih vena, kao i pronalazak mononuklearnog upalnog infiltrata ispod endotelnih stanica portalnih i centralnih vena.

Tablica 7. Semikvantitativno određivanje stupnja odbacivanja- Klasifikacija Banff

GLOBALNA PROCJENA	KRITERIJ
<b>Neodređeno</b>	Portalni upalni infiltrat ne ispunjava kriterije za dijagnozu akutnog odbacivanja
<b>Blago</b>	Infiltrati karakteristični za odbacivanje prisutni u malom broju jetrenih trijada i ograničeni su na portalni prostor
<b>Umjereno</b>	Infiltrat karakterističan za odbacivanje prisutan u većini ili u gotovo svim trijadama
<b>Teško</b>	Kao i umjereno uz prisutnu umjereno do tešku upalu perivenularno, koja se proteže na jetreni parenhim i dovodi do nekroze hepatocita

Nakon globalne procjene, dodatno se za kvantifikaciju odbacivanja procjenjuju tri posebne karakteristike: portalna upala, oštećenje žučnih vodova i upala u venulama (subendotelna upala). Svakoju kategoriji pridruži se stupanj težine upalnog procesa (bodovanje od 1 do 3) kako bi se dobio konačan zbroj, koji čini Indeks aktivnosti odbacivanja (RAI- od engl. *Rejection Activity Index*) (Tablica 8.)<sup>105</sup>.

Prema toj klasifikaciji se akutno stanično odbacivanje dijeli na *blago* (RAI 3-4), *umjereno* (RAI 5-6) i *teško* odbacivanje (RAI  $\geq 7$ ). Blago i umjereno odbacivanje zastupljeno je u gotovo 95% slučajeva. Mnogi čimbenici određuju učestalost akutnog staničnog odbacivanja: vrsta transplantacije, vrsta imunosupresije, perioperativni čimbenici (ishemija, infekcija), vrsta nadzora nakon transplantacije i osobitosti donora (dob, jetra od kadaveričnog ili živog donora)<sup>65</sup>.

I dalje je najveći problem za patologa razlikovanje rekurentne infekcije HCV i akutnog odbacivanja, zbog toga što se histološke karakteristike ova dva entiteta preklapaju. Akutno stanično odbacivanje karakteriziraju mješani upalni infiltrati s izraženim razaranjem žučnih kanalića te portalna upala malih vena, dok reinfekciju HCV obilježava portalna infiltracija mononuklearima, nekroze te manje izraženo oštećenje žučnih vodova i upalni infiltrat venula<sup>106-108</sup>.

Tablica 8. Kvantitativno određivanje stupnja odbacivanja- Rejection activity index (RAI)

KATEGORIJA	KRITERIJ	OCJENA
<b>Portalna upala</b>	A) Limfocitna infiltracija uključuje mali broj portalnih prostora	1
	B) Proširenje na veći broj portalnih prostora, s pokojim blastom, neutrofilom i eozinofilom	2
	C) Značajna proširenost na većinu ili sve portalne prostore. Upalni infiltrat čine brojni blasti, neutrofil i eozinofili; širenje u periportalni parenhim	3
<b>Upala/oštećenje žučnih vodova</b>	A) Manji broj žučnih kanalića infiltriran upalnim stanicama; prisutne blage reaktivne promjene poput povećanog omjera jezgre i citoplazme u epitelnim stanicama kanalića	1
	B) Većina kanalića infiltrirana je upalnim stanicama. Prisustvo degenerativnih promjena: nuklearni pleomorfizam, promjena polariteta i citoplazmatska vakuolizacija epitela	2
	C) Kao pod „B“, uz to što većina kanalića prikazuje degenerativne promjene u lumenu	3
<b>Upala endotela vena</b>	A) Subendotelna limfocitna infiltracija koja uključuje neke portalne i/ili jetrene vene	1
	B) Subendotelna infiltracija koja uključuje većinu ili sve portalne i/ili jetrene vene	2
	C) Kao pod „B“ s umjerenom ili teškom perivenularnom upalom koja se širi u perivenularni parenhim i povezana je s nekrozom hepatocita	3

### 1.2.5. LIJEČENJE ODBACIVANJA

Prije početka liječenja izrazito je važno definirati postojanje i stupanj akutnog staničnog odbacivanja zbog toga što i liječenje ima neželjene pojave. Isto tako, liječenje blagog odbacivanja je povezana sa slabijim preživljenjem presatka<sup>109</sup>.

Liječenje ASO-a ovisi o težini odbacivanja, odnosno RAI-indeksu i odgovoru na početno liječenje. Liječenje blagog odbacivanja (RAI 3-4) ovisi o vrsti imunosupresivnih lijekova koju bolesnik uzima. Na primjer, ako bolesnik uzima ciklosporin, tada se ciklosporin može zamijeniti takrolimusom, a ako bolesnik uzima takrolimus čija je razina u serumu supertapijska, tada je potrebno povisiti dozu. Uz to u liječenje se može dodati mikofenolat mofetil ili se njegova doza može povisiti. U svim je slučajevima potrebno pozorno pratiti vrijednosti enzima jetre u serumu. U bolesnika kod kojih se ne potvrdi snižavanje njihove razine indicirano je ponoviti biopsiju presatka. Ako nije došlo do histološkog oporavka, treba započeti liječenje visokim dozama kortikosteroida. U bolesnika sa srednje teškim i teškim ASO-om (RAI >4) optimalno liječenje temelji se na visokim dozama kortikosteroida<sup>110</sup>. Obično to uključuje intravensku primjenu metilprednizolona u dozi od 500 mg do 1.000 mg tijekom jednog do tri dana i postupno snižavanje doze do 20 mg tijekom sedam dana. Odgovor na početno liječenje važan je čimbenik u određivanju trajanja liječenja.

U većini centara za transplantaciju u liječenju akutnog staničnog odbacivanja koriste se visoke doze kortikosteroida. Nužni su u liječenju umjerenog i teškog odbacivanja<sup>111</sup>, zbog toga što inhibiraju aktivaciju limfocita (koji su inducirani antigenom presatka) na način da blokiraju oslobađanje citokina IL-1 i IL-6 iz makrofaga te blokiraju oslobađanje IL-2, čimbenika rasta limfocita. Osim toga, kortikosteroidi imaju i protuupalna svojstva. Smanjuju migraciju neutrofila i monocita na mjesto upale i sprečavaju aktivaciju stanica stabiliziranjem membrana lizozima. Konačno, visoke doze kortikosteroida imaju izravni citotoksični učinak.

Sve to objašnjava učinkovitost kortikosteroida u liječenju akutnog odbacivanja gdje sudjeluje širok raspon upalnih i imunoloških efektornih mehanizama. Međutim, brojne neželjene pojave (pojačana osjetljivost na infekcije, otežano cijeljenje rana, hiperglikemija), razlog su za oprez prilikom primjene. Naročito oprez je potreban u liječenju akutnog odbacivanja kod primatelja sa hepatitisom C, jer davanje kortikosteroida u bolusu može potaknuti pojačanu replikaciju virusa i time aktivirati osnovnu bolest u presatku. Svako značajnije akutno odbacivanje mora se liječiti zbog toga što je svaka epizoda akutnog odbacivanja korak bliže kroničnom odbacivanju i konačnom gubitku funkcije presatka.

U više od 80% bolesnika s ASO-om koji su liječeni visokim dozama kortikosteroida dolazi do normalizacije biokemijskih i histoloških pokazatelja unutar tri do pet dana po započinjanju liječenja. Promjena u vrijednosti AST-a možda je najbolji laboratorijski pokazatelj odgovora na liječenje te se pad za 50% može verificirati već nakon prve doze metilprednizolona. S druge strane, oporavak ALT-a obično kasni za AST-om te se normalizira za sedam ili više dana<sup>110</sup>.

U bolesnika s povišenim enzimima jetre, usprkos provedenom liječenju visokim dozama kortikosteroida potrebno je ponoviti biopsiju presatka. Ako i dalje postoje elementi odbacivanja presatka, postavlja se dijagnoza steroid- neosjetljivog odbacivanja. Steroid- neosjetljivo odbacivanje javlja se u manje od 10% bolesnika s ASO-om te se za liječenje koriste timoglobulin, protutijela na anti-interleukin-1 receptor (muromonab-CD3 (OKT3) ili basiliksimab), mikofenolat mofetil ili takrolimus<sup>111</sup>.

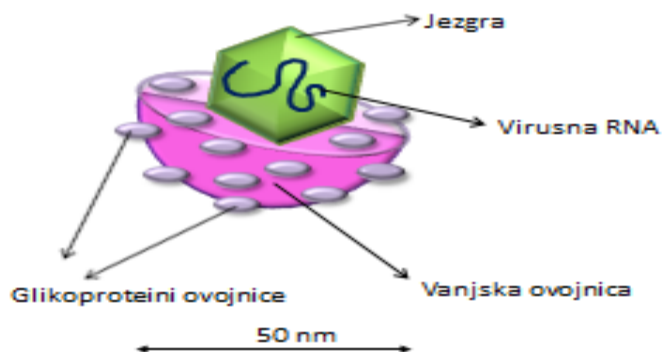
Bolesnici koji ne reagiraju na visoke doze kortikosteroida ili u kojih je to neprihvatljiv rizik, koristi se liječenje monoklonalnim protutijelima, najčešće basiliksimab i daklizumab<sup>111</sup>. Oni se vežu na alfa podjedinicu receptora za IL-2 (anti-CD25). Imunosupresiju postižu kompetitivnim antagonizmom na IL-2 aktiviranih i proliferiranih T-limfocita. Dodatak monoklonskih protutijela može značajno smanjiti stopu akutnog odbacivanja, bez povećavanja doze imunosupresivnih lijekova (kalcineurinskih inhibitora i kortikosteroida)<sup>112</sup>.

### **1.3. VIRUS HEPATITISA C (HCV)**

#### **1.3.1. EPIDEMIOLOGIJA, DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE HCV-a**

Virus hepatitisa C (HCV) malen je (~ 50 nm) obložen virus, koji se sastoji od jednostrukoga pozitivnog lanca ribonukleinske kiseline (RNA) (Slika 2.). Pripada rodu *hepacivirusa* iz porodice *Flaviviridae*. Postoji šest glavnih genotipova virusa HCV. Genotipovi 1 i 4 smatraju se rezistentnijim na liječenje. U Hrvatskoj prevladavaju genotipovi 1 i 3, dok se preostali genotipovi javljaju znatno rjeđe. Cirkulacijom dolazi do jetre, u kojoj se veže se za receptore CD81 i SR-BI u jetrenom tkivu. Ovaj virus, kao i gotovo svi drugi RNA virusi, posjeduje visok stupanj mutabilnosti, što rezultira postojanjem brojnih inačica virusa. Ova je šarolikost ujedno i razlog da ne postoji cjepivo protiv ove bolesti. Određivanje genotipa HCV-a važno je zbog prognoze i odgovora na liječenje<sup>113</sup>.

HCV čini globalni javnozdravstveni problem. Procjenjuje se da je oko 170 milijuna ljudi zaraženo ovim virusom, što čini 3% svjetske populacije<sup>114</sup>. Za Hrvatsku je procjena da je oko 1,7% populacije zaraženo HCV virusom, što čini više od 75.000 ljudi. Glavni putevi prijenosa virusa hepatitisa C su putem zaražene krvi (intravenska konzumacija droga, transfuzije krvi prije uvođenja testiranja 1993 g.) i spolni kontakti<sup>115</sup>.



Slika 2. Shema virusa hepatitisa C. Preuzeto i prilagođeno prema izvoru: Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis C: General Information. 2010.

Točna dijagnoza moguća je samo određivanjem biljega hepatitisa C. Protutijela na hepatitis C (anti-HCV) uvijek su prisutna u bolesnika koji su bili u kontaktu s virusom te nisu nužno odraz i postojanja bolesti. Za napomenuti je da zaostaju i u bolesnika nakon učinkovitog liječenja. Potvrda postojanja bolesti moguća je dokazivanjem genetskog materijala virusa (HCV RNA) te određivanjem genotipa virusa. Isto tako moguće je utvrditi i broj kopija virusa u cirkulirajućoj krvi, koji ukazuje na aktivnost virusa te služi praćenju učinkovitosti liječenja. Približno 80% akutnih infekcija prelazi u kroničnu infekciju bez značajnijih simptoma. HCV uzrokuje progresivnu upalnu bolest jetre koja vodi do fibroze tkiva te u konačnici do ciroze jetre. Bolesnici sa cirozom imaju izrazito visok rizik od nastanka hepatocelularnog karcinoma (HCC)<sup>116</sup>.

Standardni protokol liječenja je kombinacija pegiliranog interferona-alfa i ribavirina. Trajanje liječenja i mogućnost izlječenja hepatitisa C ovisna je o genotipu virusa. Kod zaraze genotipom 2 i 3 liječenje traje 24 tjedna, a izlječenje se postiže u više od 80% bolesnika. U slučaju zaraze genotipom 1 i 4 liječenje traje 48 tjedna, a izlječenje se postiže u 45% liječenih. Bolesnici u kojih nije došlo do izlječenja postaju kandidati za transplantaciju jetre koja poboljšava kvalitetu života. Nažalost, sama transplantacija ne dovodi do konačnog izlječenja HCV. Reinfekcija virusom nastaje vrlo brzo, a ponovna progresija bolesti nakon transplantacije je uglavnom ubrzana zbog primjene imunosupresivnog liječenja<sup>113,115,116</sup>.

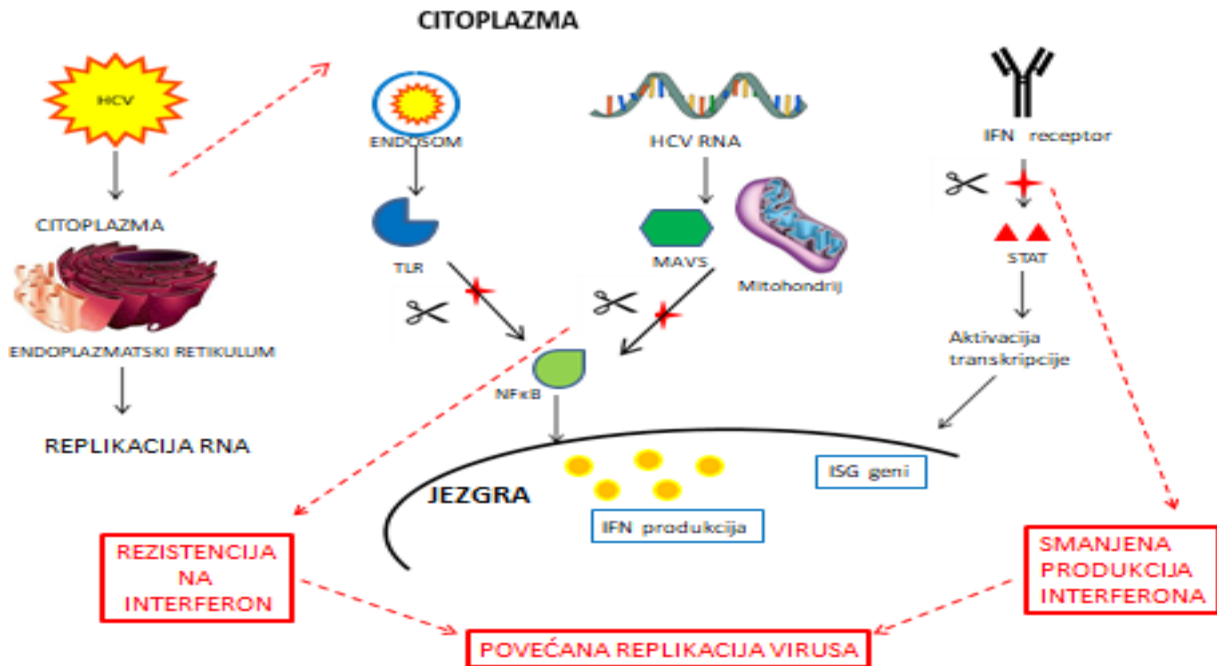
### 1.3.2. MEHANIZAM IZBJEGAVANJA IMUNOLOŠKOG ODGOVORA

Većina oboljelih od HCV je bez simptoma i dugo vremena bolest ostaje neprepoznata. Danas su prepoznati mnogi čimbenici koji utječu na brži razvoj bolesti: genetski čimbenici, zaraza u starijoj životnoj dobi (iznad 40 godina), konzumacija alkohola, pridružena infekcija drugim virusom, debljina pa čak i pušenje. Svaki virus koji dovodi do kronične infekcije uspješno izbjegava imunološki odgovor domaćina<sup>117</sup>.

Eliminacija HCV-a u akutnoj fazi ovisi o brzini poticanja urođenog imunološkog odgovora, preko sustava interferona (IFN) te odgođene aktivacije adaptivnog imunološkog odgovora. Urođena imunost preko sustava interferona igra važnu ulogu u ograničavanju infekcije HCV poticanjem gena ovisnih o interferonu (ISG) čiji proteinski produkti inhibiraju replikaciju virusa i njegovo širenje (Slika 3.)<sup>118-120</sup>.

U kroničnoj fazi infekcije, bijeg od adaptivnog imunološkog odgovora događa se zbog mutiranja virusa. Na taj se način izbjegava prepoznavanje preko protutijela i T-limfocita (CD4+ i CD8+). Prema dosadašnjim istraživanjima to se događa na više razina i čini se da je protein jezgre HCV-a (HCVc- od engl. *hepatitis C virus core protein*) ključni modulator funkcija pojedinih vrsta stanica<sup>121</sup>.

- Dendritičke stanice ključne su za adaptivni imunološki odgovor zbog toga što prezentiraju virusne antigene efektornim T-limfocitima (CD4+ i CD8+).
- Proteasom. Aktivnost unutarstaničnog proteasoma je važna za preradu antigena i prezentaciju inficiranih stanica. To je mehanizam putem kojeg stanice postaju prepoznatljive stanicama imunološkog odgovora. Dokazano je da HCVc dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS- od engl. *Reactive oxygen species*). Povećana razina oksidacijskog stresa dovodi do smanjene aktivnosti proteasoma a time i do smanjenog stvaranja peptida MHC klase I u hepatocitima.
- Aktivnost mitohondrija. Disfunkcija mitohondrija događa se pri povećanoj razini oksidacijskog stresa i odgovorna je za oštećenje tkiva. Mitohondriji predstavljaju konačni cilj za HCVc, no sam mehanizam još nije jasan. Tako da je ovo vrlo aktivno područje istraživanja.
- Upalni odgovor. Infekcija HCV je povezana sa povećanom razinom cirkulirajućih lipopolisaharida (LPS), koji su snažan promotor upalne reakcije. Nedavno je otkriveno da je TLR4 (Toll-like receptor) ključan u nastanku zloćudnog tumora jetre.



Slika 3. Jedan od predloženih mehanizama izbjegavanja imunološkog odgovora HCV-a. Bazirano na Wong MT I sur.<sup>118</sup> (IFN= interferon; ISG= IFN stimulated gene; MAVS= mitochondria antiviral signaling protein; NFκB= nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; STAT= signal transducer and activator of transcription; TLR= Toll-like receptor)

Vidljivo je da je učinak HCV-a na stanice domaćina višestruk. Preko modulacije razine oksidacijskog stresa, LPS signalizacije i produkcije citokina stvara mikroklimu koja pogoduje neadekvatnom odgovoru imunološkog sustava na virusnu infekciju. Ovo za posljedicu ima sve veće oštećenja jetrenog parenhima i proliferacije stanica. Ovi procesi dovode do različitog stupnja težine bolesti; od blagih oštećenja do ciroze jetre, a u nekih bolesnika i do nastanka HCC-a<sup>122</sup>.

### 1.3.3. PROBLEMI NAKON TRANSPLANTACIJE

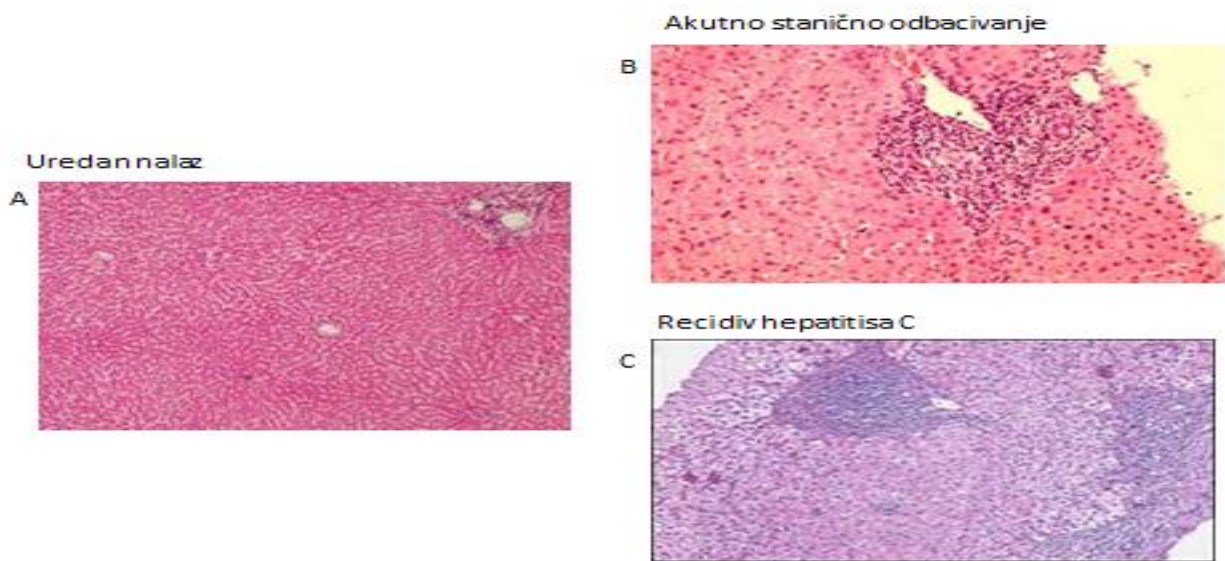
U periodu nakon transplantacije dolazi do stvaranja potpuno nove ravnoteže između HCV-a, presatka jetre, imunološkog odgovora primatelja i imunosupresivnog liječenja. Svi ti čimbenici utječu na presadak jetre. Gotovo u svih bolesnika dolazi do ponovne infekcije presatka, a viremija HCV-a dostiže, a kod nekih čak i prelazi, razinu koja je postojala prije transplantacije<sup>123</sup>.

Čini se da je imunološki sustav domaćina (uglavnom posredovan stanicama) presudan i u kontroli infekcije i u procesu odbacivanja. Dodatni problem vezan je uz činjenicu da trenutno ne

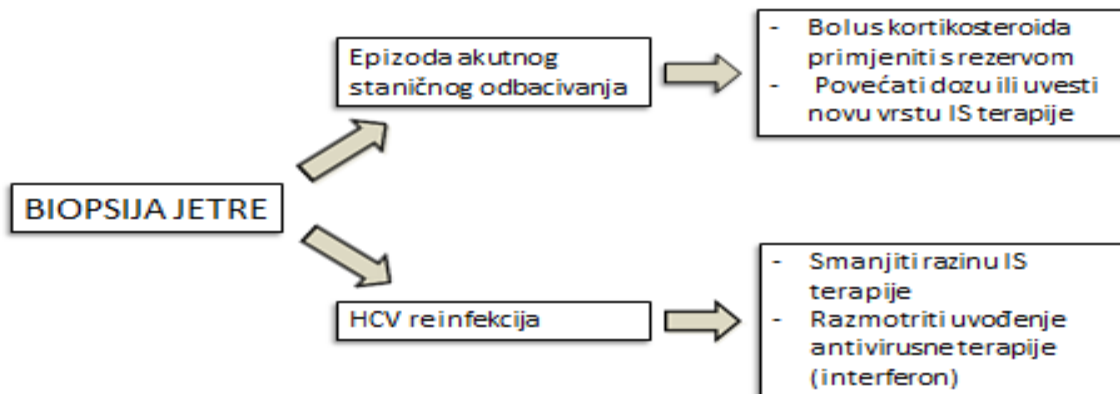


postoji jasno definirano imunosupresivno liječenje koje bi se moglo preporučiti HCV pozitivnim primateljima kako bi se spriječila reinfekcija HCV-om. Ipak, čini se logičnim kako svaka epizoda odbacivanja i povećana razina imunosupresivnih lijekova povećavaju rizik od recidiva HCV-a, preko ranije navedenih imunoloških mehanizama<sup>124,125</sup>.

Reinfekcija presatka HCV-om i epizoda odbacivanja mogu imati slične kliničke značajke, kao što je porast enzima jetre. Histopatološka procjena bioptata jetre i dalje je standardni postupak za razlikovanje ova dva entiteta. No, razlikovanje nije jednostavno budući da su oštećenja tkiva slična i da se histopatološke slike preklapaju (Slika 4.)<sup>126</sup>. Ipak, od iznimne je važnosti njihovo razlikovanje jer je liječenje ova dva stanja dijametralno suprotna. HCV pozitivni primatelji koji razvijaju akutno stanično odbacivanje imaju potrebu za povećanjem doze već prisutnog imunosuprimirajućeg lijeka ili njegovu zamjenu novom vrstom lijeka. Pokušava se izbjeći davanje visokih doza kortikosteroida kako se ne bi pogodovalo replikaciji virusa. Bolesnici u kojih je u pitanju reinfekcija HCV-om imaju korist od smanjenja razine imunosupresivnog liječenja uz eventualno uvođenje antivirusnog lijeka (npr. interferon). Iz toga proizlazi da netočna dijagnoza može dovesti do liječenja koje ne pogoduje preživljenju presatka jetre, jer su mehanizmi koji posreduju odbacivanje i reinfekciju različiti (Slika 5.)<sup>127-129</sup>.



Slika 4. Histopatološki nalaz parenhima jetre; A- uredan nalaz, B- akutno stanično odbacivanje, C- recidiv hepatitisa C (povećanje 100x, HE bojanje prikazuje kronični upalni infiltrat u portalnim prostorima u B i C; preuzeto iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, KB Merkur)



Slika 5. Diferencijalna dijagnoza: akutno odbacivanje u odnosu na reinfekciju HCV

Do sada su pokrenuta brojna istraživanja kako bi se pronašli adekvatni biljezi koji bi omogućili razlikovanje ova dva entiteta. Optimistični rezultati dobiveni su istraživanjem potencijala T-regulatornih stanica (Treg) kao biljega za akutno stanično odbacivanje i optimiziranje imunosupresivnog liječenja<sup>130</sup>. Nedavno je napredak u tehnologiji „*microarray*“ doveo do boljeg razumijevanja molekularnog profila i regulatornih mehanizama<sup>131</sup>. Analizom ekspresije gena pokazano je postojanje različitih mehanizama u nastanku staničnog odbacivanja i reinfekcije HCV-om. U akutnom staničnom odbacivanju eksprimirani su geni povezani s aktivacijom imunološkog i upalnog procesa, apoptozom, sustavom komplementa i receptorima za faktor rasta, dok je reinfekcija HCV-om predominantno povezana s ekspresijom gena staničnog ciklusa i staničnog dijeljenja, s proliferacijom stanica te procesom koagulacije<sup>131,132</sup>. Međutim, ovi biljezi tek se trebaju validirati.

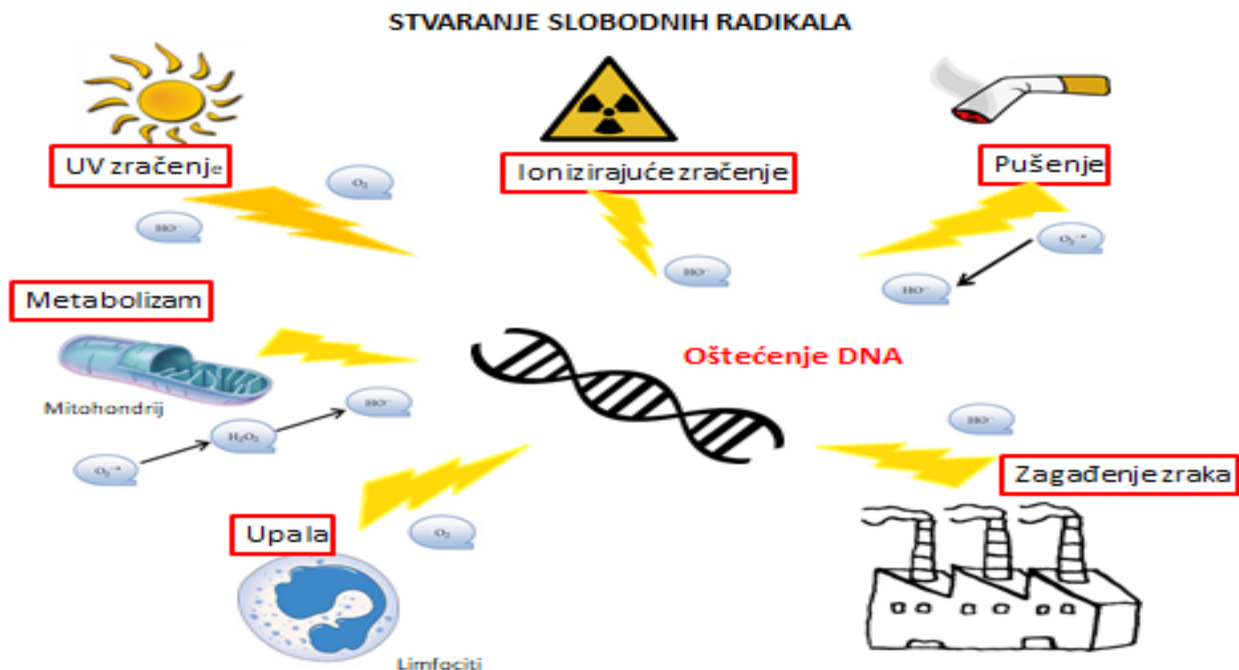
Dok se ne pronađu adekvatni biljezi, glavni ciljevi smanjenja stope reinfekcije presatka HCV-om trebali bi biti usmjereni na prevenciju akutnog staničnog odbacivanja i optimiziranje imunosupresivnog liječenja.

## 1.4. OKSIDACIJSKI STRES

Kisik je najzastupljeniji element u biološkim sustavima i kritična komponenta aerobnog života. Stvaranje energije praćeno je nastankom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS- od engl. *Reactive oxygen species*), koje oduzimanjem elektrona okolnim molekulama mogu mijenjati DNA i ometati normalnu funkciju stanica. ROS nastali tijekom metabolizma igraju važnu ulogu u prijenosu signala i aktivnosti gena; utječu na aktiviranje nuklearnih receptora i njihovih čimbenika transkripcije, na funkcioniranje imunološkog sustava, kao i na proces starenja. Oksidacijski stres definira se kao nesrazmjer ravnoteže između nastanka ROS-a i antioksidacijske zaštite, koja se sastoji od antioksidansa male molekularne mase (npr. glutationa) i antioksidacijskih enzima (npr. superoksid-dismutaze).

Slobodni radikali mogu biti stvoreni iz egzogenih izvora (npr. toksini iz okoliša, pušenje, alkohol, bakterijski toksini, virusi) ili endogeno u našem organizmu (npr. u mitohondrijima ili aktivacijom fagocita). ROS proizvode i neki oksidacijski enzimi u stanicama (npr. ksantin-oksida) pod utjecajem ranije navedenih vanjskih čimbenika. Isto tako, dvije vrste imunoloških stanica, makrofagi i neutrofili, sudjeluju u obrani organizma od mikroorganizama. Ove stanice sadrže skupinu enzima, NADPH-oksida kompleks, koji svojom aktivacijom proizvode radikale superoksida i vodikovog peroksida. U ovom slučaju možemo reći da je produkcija ROS-a poželjna jer ima centralnu ulogu u uništenju stranih patogena<sup>133</sup>.

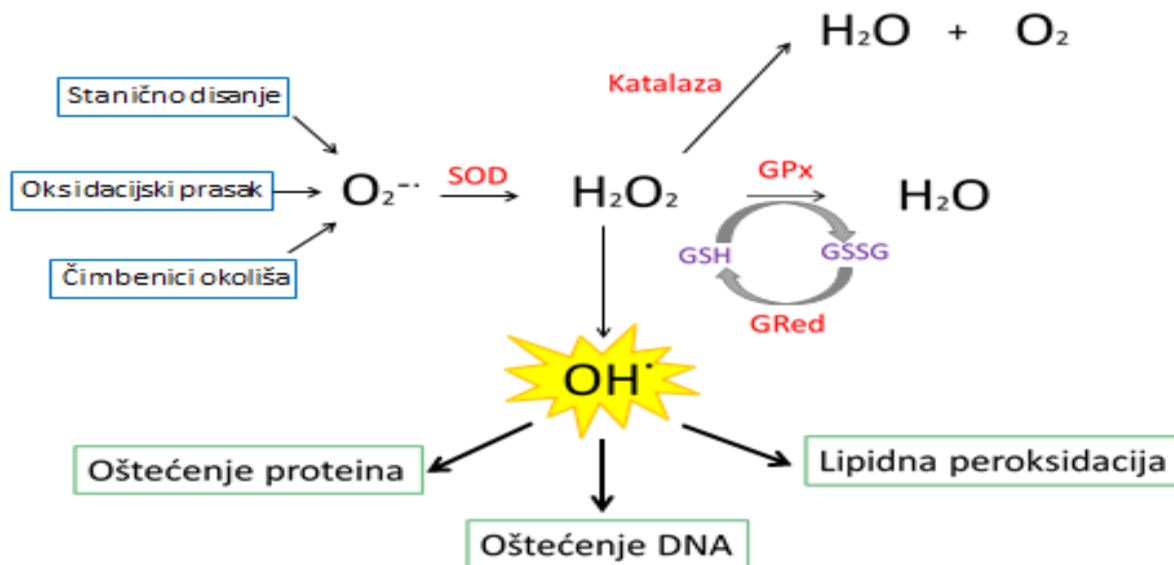
Slobodni radikali uzrokuju izravno oštećenje okolnog tkiva i važnih biomolekula, kao što su DNA, lipidi i proteini. Međutim, osim što uzrokuju štetu putem lipidne peroksidacije i oksidacijskog oštećenja molekule DNA, također sudjeluju u procesu adaptacije i regulacije unutarstaničnih signalnih putova. Također, imaju važnu ulogu u regulaciji tonusa glatkih mišića i baktericidnu funkciju fagocita<sup>134</sup>.



Slika 6. Najčešći izvori oksidacijskog stresa. Prilagođeno prema izvoru: Cadenas E i sur.<sup>135</sup>

#### 1.4.1. BIOLOŠKO DJELOVANJE SLOBODNIH RADIKALA

Oksidacijski stres može uzrokovati oštećenje na svim molekularnim razinama stanice: na DNA, proteinima i lipidima. Često je vrlo teško odrediti početnu točku oštećenja, budući da se mehanizmi preklapaju<sup>135,136</sup>.



Slika 7. Biološko djelovanje slobodnih radikala. Prilagođeno prema izvoru: Adly AAM i sur.<sup>133</sup> (SOD= superoksid dismutaza; GPx= glutation peroksidaza; GRed= glutation reduktaza)

### Oštećenje DNA

Slobodni radikali kisika mogu izravno oštetiti molekulu DNA; bilo šećer, bilo fosfat, bilo purinsku ili pirimidinsku bazu. S druge strane, oksidacijsko oštećenje DNA može biti neizravno preko porasta kalcijevih iona unutar stanice. Ovim reakcijama mogu se izazvati promjene u strukturi DNA (npr. izrezivanje baza, mutacije parova baza, delecije, umetanja i amplifikacije pojedinih slijedova)<sup>137</sup>.

### Oštećenje proteina

Oštećenje proteina slobodnim radikalima dovodi do inaktivacije i denaturacije proteina poput enzima i membranskih ionskih transportera. Najčešće zahvaćeni enzimi su alfa-1 antiproteaza, kalmodulin, kalcij-ATPaza, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza<sup>138</sup>. Osjetljivost proteina na slobodne radikale najviše doprinose aminokiseline koje sadrže sumpor (metionin i cistein).

### Lipidna peroksidacija (LPO)

Iako lipidna peroksidacija zahvaća brojne stanične komponente, primarno mjesto oštećenja su višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA- od engl. *Polyunsaturated fatty acids*).

Peroksidacija PUFA i kolesterola mijenja fluidnost i karakteristike propusnosti stanične membrane, što na kraju može izazvati opsežno oštećenje membrane. Daljnjom razgradnjom lipida peroksidacijom, dobiva se široka paleta spojeva, uključujući malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) i akrolein (ACR).

U kliničkoj praksi nije moguće izravno mjeriti razinu slobodnih radikala radi njihovog kratkog poluvremena života. Međutim, moguće je evaluirati biljege oksidacijskog stresa. Potraga za alternativnim neinvazivnim biljezima slobodnih radikala u kliničkim uzorcima je duga i još uvijek traje<sup>139</sup>. Do sada nije pronađen savršeno učinkovit i koristan biljeg. Međutim, najčešće pretrage koje se upotrebljavaju navedene su u Tablici 9.<sup>140</sup>

Tablica 9. Evaluacija oksidacijskog stresa. Prilagođeno prema izvoru: Ho E i sur.<sup>140</sup>

<b>MOLEKULSKI POKAZATELJI OKSIDACIJSKOG STRESA</b>	
<b>LIPIDNA PEROKSIDACIJA</b>	MDA (malondialdehid)
	HNE (4-hidroksinonenal)
	ACR (akrolein)
	TBARS (od engl.- thiobarbituric acid reactive substances)- reaktivne vrste tiobarbituratne kiseline
	Izdahnuti alkali
<b>OKSIDACIJA PROTEINA</b>	Koncentracija karbonila
	Oksidativna modifikacija proteina (nitrotirozin, stvaranje S-glutationa)
<b>OŠTEĆENJE DNA</b>	8-okso-2-deoksiguanozin
<b>EKSPRESIJA GENA</b>	NRF2 (Nuclear factor (erythroid derived 2)-related factor 2)
<b>ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET</b>	Ciklička voltometrija
	Sposobnost uklanjanja vodikovog peroksida
	Antioksidacijski kapacitet u serumu (aktivacija antioksidacijskih enzima poput katalaze, glutation-peroksidaze 1 (GPX-1) i superoksid-dismutaze (SOD))
<b>BILJEZI OKSIDACIJSKOG STRESA U TKIVU</b>	Oksidirani LDL (oxLDL)
	ADMA (asimetrični dimetilarginin)

## 1.4.2. LIPIDNA PEROKSIDACIJA I BILJEZI OKSIDACIJSKOG STRESA

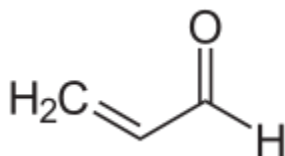
Oksidacijski stres čini molekulsku podlogu nastanka različitih bolesti, ali i fizioloških procesa. Razliku između fiziološkog i patološkog oksidacijskog stresa određuje razina utjecaja na tkivo ili stanicu. Također, ista razina oksidacijskog stresa za jednu vrstu stanica može biti toksična, dok je za drugu ona tek suprafiziološka, bez štetnih posljedica<sup>141</sup>. Ukoliko inicijacija LPO nije kontrolirana obrambenim mehanizmima, započet će lančanu reakciju koja može dovesti do oštećenja okolnih molekula. Dakle, ako nema dovoljno antioksidansa, doći će do faze propagacije i nastanka lančane reakcije LPO. Završni produkti LPO su reaktivni aldehidi, kao što su akrolein (ACR), 4-hidroksinonenal (HNE) i malondialdehid (MDA), koji dovode do progresije oksidacijskog oštećenja, oštećuju stanice i uzrokuju njihovu smrt (Tablica 9.). Dugo vremena su reaktivni aldehidi (MDA, HNE i ACR) bili smatrani toksičnim završnim produktima LPO. Međutim danas je poznato da imaju iznimno snažnu biološku ulogu u mnogobrojnim putevima prijenosa staničnih signala u fiziološkim i patološkim stanjima. Uključeni su u procese regulacije staničnog ciklusa<sup>142</sup>.

Zbog svoje kemijske reaktivnosti, reaktivni aldehidi stvaraju kovalentne veze sa makromolekulama. Osim toga, služe i kao biljezi LPO tj. oksidacijskog stresa. Za razliku od reaktivnih slobodnih radikala, reaktivni aldehidi su relativno dugoživi (minute u odnosu na ns za slobodne radikale), što im omogućuje da djeluju na mjestima udaljenim od mjesta nastanka, ekstracelularno i/ili intracelularno<sup>143</sup>.

Unatoč tome što se oksidacijsko oštećenje molekula pojavljuje u gotovo svim bolestima čovjeka, značajnu patološku ulogu ima u samo nekima. Odnos između LPO i bolesti se stalno istražuje, a odnos između bioloških učinaka i kemijskih interakcija LPO su složeni i nedovoljno definirani<sup>144-146</sup>.

### 1.4.2.1. AKROLEIN (ACR)

Akrolein je najjednostavniji nezasićeni aldehyd prisutan u hrani i okolišu. Nastaje iz ugljikohidrata, biljnih ulja i životinjskih masti, te iz aminokiselina tijekom zagrijavanja hrane i sagorijevanjem naftnih goriva i biodizela.



Slika 8. Strukturni prikaz akroleina. Preuzeto i prilagođeno:

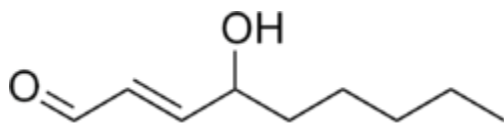
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acrolein>

U organizmu čovjeka nastaje dehidracijom glicerola te lipidnom peroksidacijom višestrukonezasićenih masnih kiselina. Glavni endogeni izvor akroleina nastaje razgradnjom aminokiseline treonina te spermina i spermidina, naročito u stanjima oksidacijskog stresa i upale. Najveći egzogeni izvor akroleina je dim cigarete kojemu je ljudski organizam izložen<sup>147</sup>.

Akrolein se metabolizira konjugacijom s glutationom, a iz organizma se izlučuje urinom u obliku metabolita merkaptourične kiseline. Biološki učinak akroleina posljedica je njegove interakcije s biološkim makromolekulama, što za posljedicu ima nastanak mutacija, promijenjenu transkripciju gena i modulaciju apoptoze.

#### 1.4.2.2. 4-HIDROKSINONENAL (HNE)

4-hidroksinonenal ili 4-hidroksi-2-nonenal je  $\alpha,\beta$  nezasićeni aldehid, koji nastaje kao produkt LPO u stanicama. HNE nastaje peroksidacijom omega-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina (najčešće arahidonska i linolna kiselina)<sup>142</sup>.



Slika 9. Strukturni prikaz 4-hidroksinonenala. Preuzeto i prilagođeno:

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxynonenal>

Zbog visoke reaktivnosti, HNE stupa u odnos s raznim staničnim makromolekulama. Stvarajući stabilne konjugate s proteinima, HNE utječe na signalne putove koji kontroliraju rast, diferencijaciju i apoptozu stanica. Upravo zbog toga, ima ulogu u procesu oštećenja tkiva, disfunkciji organa i starenja. Uloga HNE-a spominje se i u nastanku kroničnih upalnih i neurodegenerativnih bolesti, akutnog respiratornog distress sindroma (ARDS- od engl. *Acute respiratory distress syndrome*), ateroskleroze, dijabetesa i raznih vrsta karcinoma. Nadalje, HNE se spominje i kao biljeg oksidacijskog stresa, u kojem ima ulogu „drugog glasnika“ u regulaciji brojnih staničnih putova<sup>148,149</sup>. Njegova biološka aktivnost ovisi o unutarstaničnoj koncentraciji, koja posljedično tome drugačije modulira staničnu smrt, rast i diferencijaciju<sup>150</sup>.

HNE se eliminira konjugacijom s glutationom koji se dalje iz stanice izbacuje glutation-S-transferazom. Mehanizmi odgovorni za održavanje unutarstanične razine HNE-a su neobično važni, ne samo zbog sudjelovanja u obrani organizma od oksidacijskog stresa nego i zbog uključenosti u patofiziologiju brojnih bolesti<sup>151</sup>.



### 1.4.3. ANTIOKSIDANSI - OBRANA STANICE OD OKSIDACIJSKOG STRESA

Kako bi se osigurala homeostaza, stanice posjeduju i snažnu antioksidacijsku obranu protiv ROS-a. Općenito, antioksidacijski mehanizmi dijele se na enzimatske i ne-enzimatske sustave.

Enzimatski mehanizmi uz pomoć kaskadnih reakcija dovode do potpunog odstranjenja ROS-a. Glavni enzimi koji pretvaraju ROS u manje reaktivne molekule su superoksid dismutaza, katalaza i glutation-peroksidaza<sup>152</sup>. Prema načinu djelovanja mogu se dodatno podijeliti u dvije skupine: prva ostvaruje izravnu interakciju sa ROS-om, a druga regulira redoks-reakcije.

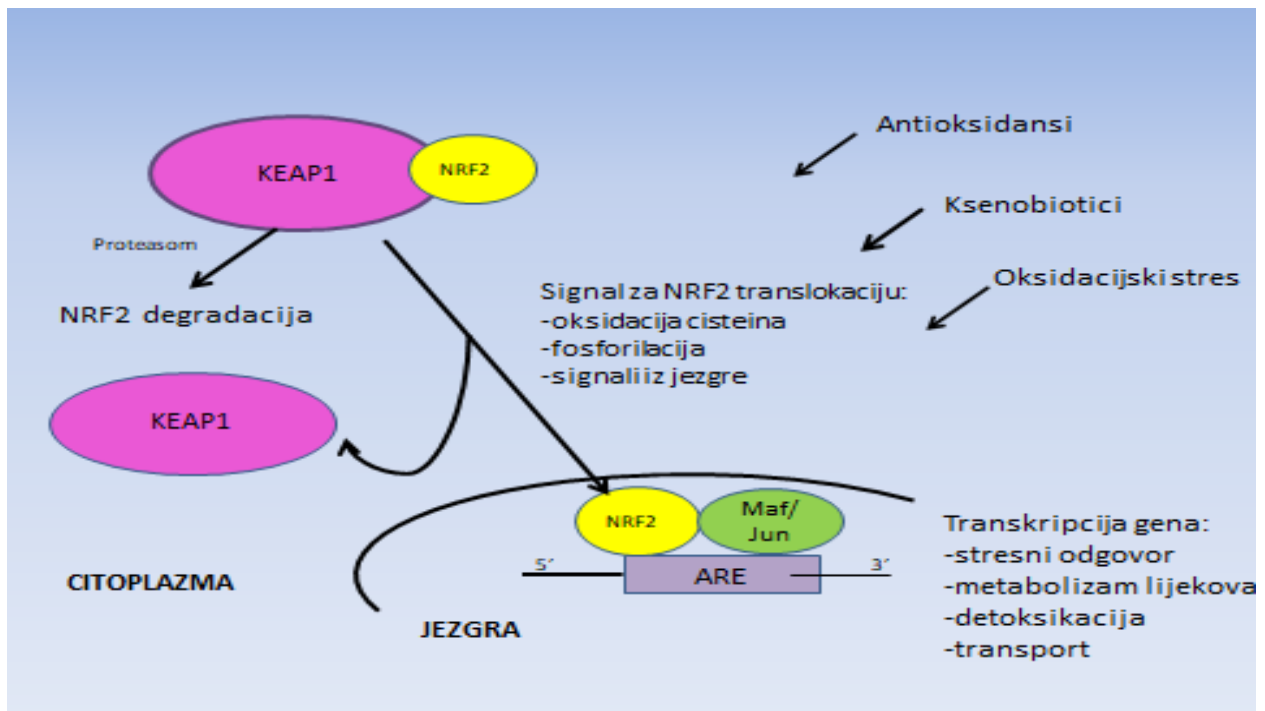
Ne-enzimski mehanizmi su manje specifični u odnosu na enzimatske, ali čine prvu liniju antioksidacijske obrane. Stoga su vrlo važni u odgovoru stanice na oksidacijski stres. Glavni predstavnici su vitamini C i E. Vitamin C reagira s ROS te se stvaraju stabilne molekule koji, u odnosu na ROS, imaju snižen kapacitet za daljnje izazivanje oksidacijskog oštećenja. Vitamin E zaustavlja kaskadu lipidne peroksidacije<sup>153</sup>.

U zdravih osoba, antioksidansi čine primarnu obranu organizma od ROS-a doniranjem elektrona slobodnim radikalima te ih na taj način inaktiviraju<sup>154</sup>.

#### 1.4.3.1. NUCLEAR FACTOR (ERYTHROID-DERIVED 2)-LIKE 2 (NFE2L2 ILI NRF2)

NRF2 je čimbenik transkripcije koji regulira ekspresiju antioksidacijskih enzima faze 2. Stanica suočena s visokom razinom oksidacijskog stresa, mora brzo povećati svoj antioksidacijski kapacitet kako bi održala homeostazu.

Čimbenik transkripcije NRF2 (NRF2- od engl. *nuclear factor (erythroid derived 2)-related factor 2*) djeluje kao ključni kontrolor u genskoj regulacijskoj mreži redoks homeostaze. U fiziološkim uvjetima NRF2 je lociran u citoplazmi, vezan na inhibitorni protein KEAP1 (KEAP 1- od engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*). Na ovaj se način NRF2 označava za degradaciju u proteasomu. Pod utjecajem oksidacijskog stresa, NRF2 signalni put se aktivira, KEAP1 se oksidira te se NRF2 otpušta i premješta u jezgru, i veže na elemente ARE (element aktiviran antioksidansima engl. *Antioxidant Response Element*) i na taj način povećava transkripciju gena koji kodiraju antioksidacijske enzime. Na ovaj se način uspostavlja homeostaza (Slika 10.)<sup>155,156</sup>.



Slika 10. Mehanizam aktivacije i djelovanja NRF2. Prilagođeno prema izvoru: Aleksunes LM i sur.<sup>156</sup>

Signalni put KEAP1-NRF2 regulira aktivnost više od 600 citoprotektivnih gena koji kodiraju nastanak antioksidacijskih enzima (enzimi koji sudjeluju u sintezi i regeneraciji glutaciona), enzima koji sudjeluju u konjugaciji, proteina koji povećavaju izbacivanje ksenobiotika i njihovih metabolita iz stanice, enzima koji inhibiraju upalni odgovor, proteina koji štite od toksičnosti teških metala, proteina koji sudjeluju u popravku i otklanjanju oštećenih proteina te proteina koji reguliraju ekspresiju drugih transkripcijskih faktora i faktora rasta<sup>157,158</sup>.

Stoga ne čudi da se NRF2 istražuje kao ciljna molekula u svrhu liječenja raznih bolesti: karcinoma, kroničnih upalnih bolesti (kardiovaskularnih i pulmoloških) i neurodegenerativnih bolesti<sup>159</sup>. Isto tako potrebno je istražiti aktivaciju NRF2, i njegovu potencijalnu ulogu tijekom regeneraciji jetre<sup>160,161</sup>.

#### 1.4.4. POVEZANOST OKSIDACIJSKOG STRESA I BOLESTI

Oksidacijski stres može uzrokovati ozljedu tkiva putem stanične smrti, a koja se može pojaviti u obliku dva mehanizma: nekroze i apoptoze<sup>162</sup>.

Oksidacijski stres je prepoznat kao medijator u nastanku mnogih akutnih i kroničnih bolesti, uključujući karcinome, kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, bolesti pluća i dijabetes. Isto tako, uključen je i u normalan proces starenja (Tablica 10.)<sup>163,164</sup>. Međutim, izravna povezanost oksidacijskog stresa i bolesti još uvijek nije dokazana zbog nedostatnih metoda identifikacije oksidacijskog statusa u ljudi *in vivo*.

Tablica 10. Bolesti povezane s prekomjernom produkcijom ROS-a.

<b>BOLESTI I STANJA VEZANE UZ OKSIDACIJSKI STRES:</b>
<b>Kardiovaskularne bolesti</b>
<b>Ateroskleroza</b>
<b>Razni tipovi zloćudne bolesti</b>
<b>Dijabetes</b>
<b>Neurodegenerativne bolesti (Parkinsonova, Alzheimerova bolest)</b>
<b>Toksičnost teških metala</b>
<b>Radijacijska ozljeda</b>
<b>Deficijencija vitamina</b>
<b>Toksičnost pojedinih lijekova</b>
<b>Upala</b>
<b>Toksični efekt dima cigarete</b>
<b>Emfizem</b>
<b>Katarakta</b>

#### 1.4.4.1. OKSIDACIJSKI STRES I INFEKCIJA VIRUSOM HEPATITISA C

Kao što je rečeno, ravnoteža između ROS-a i antioksidacijskih mehanizama je iznimno važna. Međutim, mala količina ROS-a može biti poticajna za organizam jer dovodi do aktivacije enzima i čimbenika transkripcije te na taj način olakšava komunikaciju između stanica. Evolucijski gledano, izazov je razviti antioksidacijsku obranu kojom se postiže dovoljno zaštite, uz minimalno oštećenje stanica i tkiva.

Potreba za redoks ravnotežom uz minimalna oštećenja posebno je naglašena prilikom borbe organizma protiv infekcije pri čemu se fagociti oksidacijskim praskom bore protiv patogena.

Svi patogeni, bez obzira na klasifikaciju (bakterije, virusi ili paraziti), utječu na povećanu fagocitoznu aktivnost u tkivu domaćina, što ukazuje na mikrobicidnu ulogu ROS-a<sup>165</sup>. Nasuprot tome, brojne studije su pokazale povećanu osjetljivost na bakterijske i gljivične infekcije u osobe kojima je smanjena ili nedostaje antioksidacijska stanična aktivnost (npr. u slučaju infekcija virusom HIV)<sup>166</sup>.

Slobodni radikali imaju važnu ulogu u uklanjanju patogena, a za nuspojavu imaju ozljedu tkiva domaćina (imunopatologija). To je osobito vidljivo tijekom kronične upale, jer može uzrokovati opsežna oštećenja tkiva zbog dugotrajnog oksidacijskog stresa. Zbog prisustva slobodnih radikala regrutiraju se makrofagi i neutrofil, kako bi se zaustavila invazija mikroorganizama. Unutarstanični patogeni, u koje spada i HCV, inficiraju aktivirane makrofage (fagocite). Zbog toga se infekcija sistemski širi organizmom, a proupalni citokini dodatno privlače makrofage, koji se protiv infekcije bore sintezom protuupalnih citokina (IL-10 i TGF- $\beta$ )<sup>167</sup>.

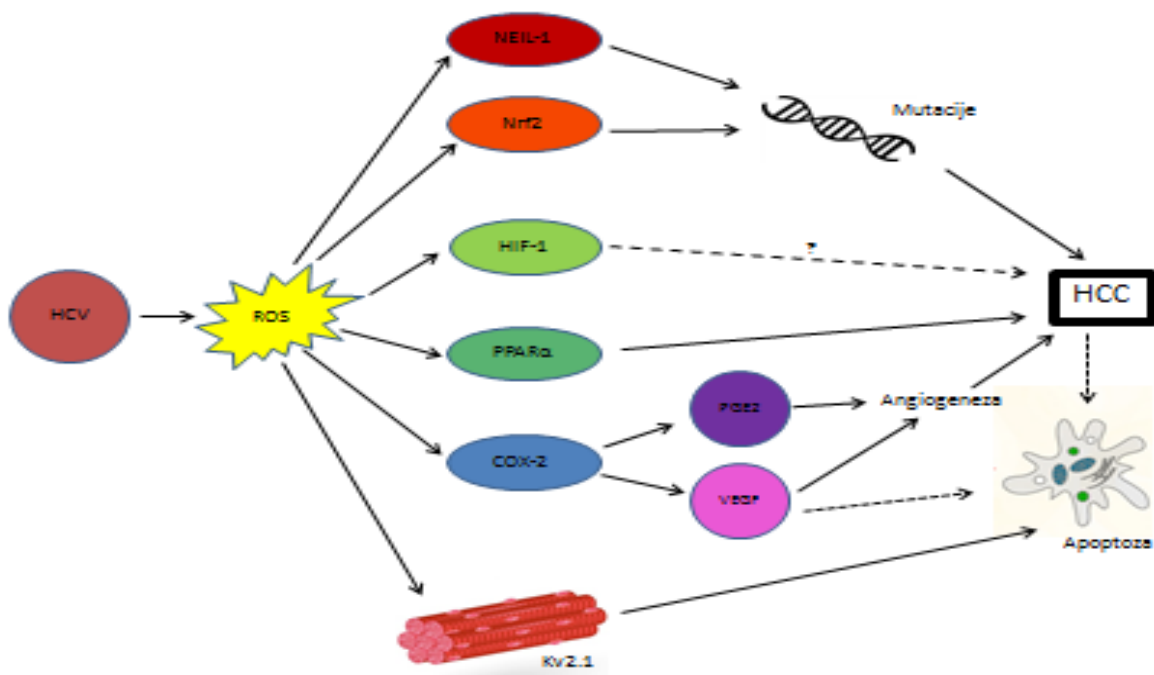
Budući da jetra ima važnu ulogu u metabolizmu i u detoksikaciji štetnih tvari, u virusnoj infekciji jetre smanjena je sposobnost stanice da metabolizira pro-oksidacijske spojeve. Tijekom bolesti jetre (kao što hepatocelularne ili kolestatske bolesti), nastali ROS potiče lučenje velikog broja citokina i čimbenika rasta. U konačnici dolazi do sve većeg stvaranja ROS-a, a stanica se nalazi pod štetnim utjecajem mehanizama pozitivne povratne sprege. Mnogi humani virusi koji uzrokuju kroničnu infekciju, kao što je i HCV, manipuliraju ovom delikatnom ravnotežom između pro- i antioksidansa. HCV generira stanje kroničnog oksidacijskog stresa koji uzrokuje oštećenje tkiva jetre, ali i potiče regenerativne procese kako bi se smanjila količina oštećenja<sup>168,169</sup>. Međutim, studije su pokazale kako je izmjerena razina oksidacijskog stresa uvijek viša od razine zaštitnih antioksidacijskih parametara<sup>170</sup>.

Iako molekularni mehanizmi patogeneze HCV-a ostaju nejasni, oksidacijski stres se nametnuo kao glavni pokretač razvoja oštećenja jetre<sup>171</sup>. Sama evaluacija oksidacijskog stresa može biti korisna za bolje razumijevanje patogeneze HCV-a. Steatoza jetre jedan je od najvažnijih patohistoloških značajki u bolesnika s kroničnim HCV-om. Nastaje djelovanjem virusa, ali i zbog čimbenika koji su vezani za domaćina<sup>172</sup>.

Promijenjena regulacija i aktivnost biokemijskih puteva uključenih u metabolizma lipida povezani su s nakupljanjem ROS-a tijekom infekcije virusom HCV. Produkti lipidne peroksidacije povišeni su u serumu, mononuklearima periferne krvi, i u tkivu jetre oboljelih od HCV. Virusna infekcija dovodi do smanjenja stanične koncentracije glutationa (GSH) što za posljedicu ima oksidaciju staničnih makromolekula (proteini, DNA i lipidi). Oksidacijski stres induciran virusom HCV pridonosi širenju virusa i modulira translaciju genoma virusa<sup>173,174</sup>. Ovaj nesrazmjer i kronično podržavanje oksidacijskog stresa u konačnici dovodi do nastanka ciroze i hepatocelularnog karcinoma<sup>175</sup>.

Infekcija virusom HCV potiče stvaranje ROS čime se „troše“ antioksidansi u jetri, i na taj se način pogoršava oksidacijski stres. U kombinaciji s drugim aktiviranim signalnim putevima, uz

poremećaj u metabolizmu lipida i glukoze koji prate perzistentnu HCV infekciju, oksidacijski stres dovodi do karcinogeneze. Prelazak steatoze u hepatocelularni karcinom je česta pojava (20-30%), nastaje relativno brzo i multifokalno zahvaća jetreni parenhim<sup>176,177</sup>. Specifični čimbenici rizika za razvoj HCC-a u kroničnoj infekciji virusom HCV su: istovremena prisutnost druge bolesti jetre, genotip virusa, čimbenici vezani uz način života, prekomjerna tjelesna masa i šećerne bolesti<sup>176</sup>. Najvjerojatnije su sve to razlozi zbog kojih većina bolesnika ima prisutan HCC u vrijeme kada se stekne indikacija za transplantaciju jetre, makar on ne mora biti makroskopski vidljiv.



Slika 11. Dijagram koji prikazuje moguće mehanizme povezanosti HCV-induciranog oksidacijskog stresa i hepatokarcinogeneze. Prilagođeno prema izvoru: Ivanov AV i sur.<sup>175</sup>

Mehanizam djelovanja oksidacijskog stresa uključuje nakupljanje oštećene DNA uslijed povećanog ROS-a i smanjene sposobnosti popravljanja DNA (smanjena regulacija NEIL-1 DNA glikozilaze) te istovremena aktivacija NRF2/ARE antioksidacijskog obrambenog puta. HCV-inducirani oksidacijski stres također pogoduje razvoju tumora povećanjem unosa glukoze i adaptacijom glikolize, preko hipoksijom potaknutog čimbenika 1 (HIF-1). Isto tako, promiče se i angiogeneza aktivacijom ciklooksigenaze 2 (COX-2), koja dovodi do povećanog stvaranja prostaglandina E (PGE2) i vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF). Osim toga, ROS

aktivira peroksidom potaknut proliferirajući receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) i blokira proapoptički kalcijev ionski kanal Kv2.1, što također pospješuje karcinogenezu (Slika 11.)<sup>175</sup>.

#### 1.4.5. OKSIDACIJSKI STRES I TRANSPLANTACIJA JETRE

Stvaranje slobodnih radikala povećano je u većini stanja koja dovode do insuficijencije jetre, naročito u akutnom zatajenju jetre<sup>178</sup>, alkoholnoj cirozi<sup>179</sup>, hepatitisu C<sup>180,181</sup> i nealkoholnom steatohepatitisu (NASH)<sup>182</sup>. Nesrazmjer između stvaranja i odstranjivanja ROS-a rezultira oksidacijskim stresom, zbog čega se u hepatocitima nakuplja Ca<sup>2+</sup>, sintetizira NO, aktiviraju se kaspaze, povećava se ekspresija citokina te oštećenje makromolekula (lipida, proteina i DNA). Između nekoliko predloženih modela ozljede tkiva, lipidna peroksidacija se čini kao najizgledniji uzrok hepatocelularnog oštećenja<sup>183,184</sup>.

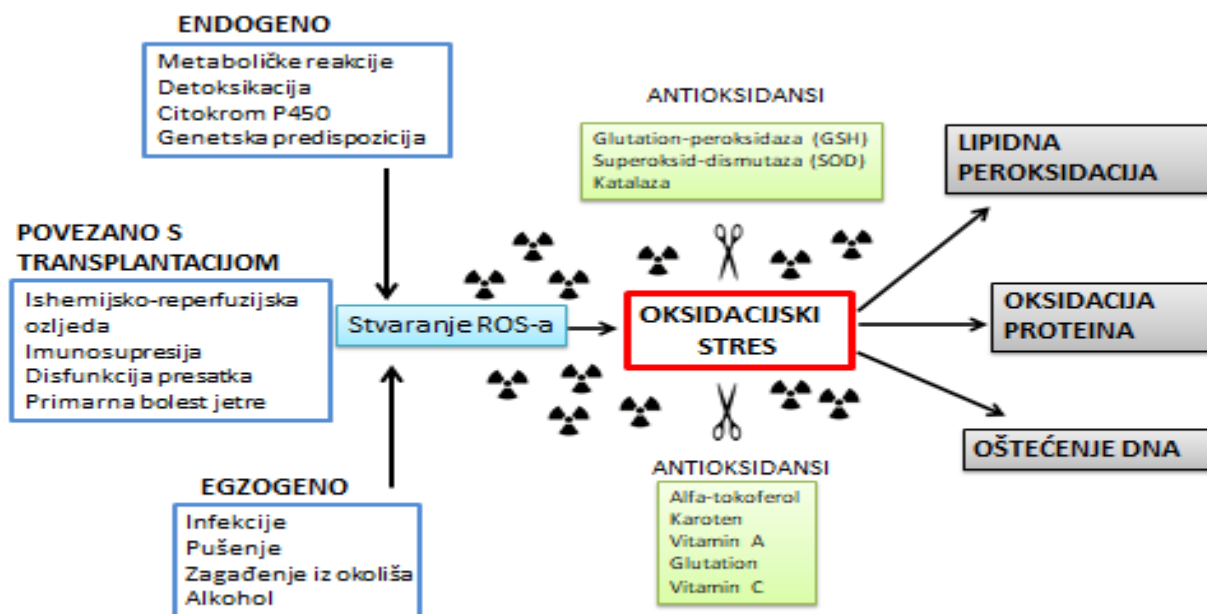
U primatelja jetre, ROS stvoren prije transplantacije ne eliminira se u potpunosti nakon zahvata i može biti uzrokom lošije funkcije presatka<sup>185</sup>. Pokazalo se da je transplantacija jetre samo djelomično povezana s dugoročnim poboljšanjem redoks statusa u bolesnika s terminalnim stadijem bolesti jetre<sup>186</sup>. Biljezi oksidacijskog stresa u bolesnika s cirozom ostali su povišeni i do mjesec dana nakon transplantacije<sup>187,188</sup>.

Oksidacijski stres u jetri primatelja nakon transplantacije dijelom proizlazi iz ishemijsko-reperfuzijske ozljede (IRO), postoperativnih komplikacija (odbacivanje, ishemija, infekcija i kolestaza), imunosupresije te samog primarnog poremećaja jetre koji je doveo do transplantacije<sup>189</sup>.

Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (IRO) je najčešća pojava i najmanje razjašnjen problem koji se javlja u bolesnika nakon transplantacije jetre. Njeno postojanje u presatku jetre dovodi do primarne disfunkcije presatka i akutnog odbacivanja<sup>190</sup>. U ranom peritransplantacijskom periodu sinusoidalne endotelne stanice su posebno podložne ozljedi. Međutim, usprkos značajnim strukturalnim promjenama koje prolaze tijekom ishemije, one ipak ostaju vitalne sve do vremena reperfuzije<sup>191</sup>. Oksidacijska ozljeda se događa vrlo brzo i dosiže svoju maksimalnu razinu pet minuta nakon početka reperfuzije, a zatim se postepeno smanjuje do normalnih vrijednosti<sup>192</sup>. Aktivacijom Kupfferovih stanica (stanice koje pripadaju retikuloendotelnom sustavu i imaju sposobnost fagocitiranja) pokreće se oslobađanje citokina<sup>193</sup>, aktivacija komplemента<sup>194</sup> i stvaranje ROS-a<sup>195</sup>. Prilikom reperfuzije iz Kupfferovih stanica se oslobađa TNF- $\alpha$ , dobro poznati medijator koji sudjeluje u apoptozi stanica<sup>196</sup>.

Ishemija tkiva najviše utječe na energetske rezerve stanice. Smatra se da je početni izvor slobodnih kisikovih radikala sustav hipoksantina i ksantin oksidaze (XO). Tijekom hipoksije se adenosin-trifosfat (ATP) razgrađuje i tako nastaje hipoksantin. Pojačana razgradnja ATP-a

dovodi do smanjenja energije, a time i do slabijeg funkcioniranja enzima i proteinskih pumpi. Ovo se posebno odnosi na pumpu za transport kalcija. Smanjenje energije dovodi do povećanog unutarstaničnog nakupljanja kalcija, što za posljedicu ima disfunkciju enzima ksantin-dehidrogenaze (XDH), koji u normalnim uvjetima razgrađuje hipoksantin do urične kiseline. Pri tome koristi nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) koji se reducira u NADH. U stanju hipoksije XDH prolazi kroz promjenu te zadržava enzymatsku aktivnost uz promjenu kofaktora i postaje ksantin oksidaza (XO). U fazi reperfuzije nagomilani hipoksantin i XO dovode do nastanka slobodnih radikala, koji pokreću kaskadu oštećenja stanice lipidnom peroksidacijom<sup>197</sup>.



Slika 12. Čimbenici oksidacijskog stresa povezani s transplantacijom jetre. Prilagođeno prema izvoru: Czubkowski P i sur.<sup>189</sup>

Upala endotela krvnih žila, oštećenje žučnih kanalića i upalna infiltracija portalnih prostora limfocitima, neutrofilima i eozinofilima nalaze se u podlozi akutnog odbacivanja presatka jetre<sup>198</sup>. Eozinofili sadrže eozinofilnu peroksidazu, enzim koji može katalizirati nastanak visoko oksidativnih vrsta koje dovode do stanične ozljede. Infiltracija eozinofila ima ključnu ulogu u patogenezi akutnog odbacivanja, prema nekim autorima, i prediktivnu vrijednost<sup>199</sup>.

Imunosupresivno liječenje se smatra dodatnim čimbenikom rizika za povećano stvaranje slobodnih radikala. Najčešće korišteni imunosupresivi dolaze iz skupine kalcineurinskih inhibitora (CNI), a među glavnim predstavnicima su ciklosporin A i takrolimus.

Ciklosporin A (CsA) je imunosupresiv koji se koristi u transplantacijskoj kirurgiji i za liječenje autoimunih bolesti, ponajprije radi svoje sposobnosti da inhibira prijenos signala preko receptora na T-limfocitima. Dokazano je da CsA može potaknuti stvaranje ROS-a i lipidnu peroksidaciju te na taj način uzrokuje nefro-, hepato- i kardiotoksičnost<sup>200</sup>. U animalnim modelima pokazano je kako mijenja pro- i antioksidativno stanje u hepatocitima miša, u korist prooksidacijskog procesa. To izravno dokazuje kako je oksidacijski stres dio mehanizma kojim CsA pogoduje oštećenju stanice jetre. Ovaj mehanizam mogao bi biti relevantan i *in vivo*<sup>201</sup>.

Takrolimus (Tac) je imunosupresiv iz skupine CNI, koji svoje djelovanje ostvaruje suprimiranjem proliferacije T-limfocita. Neki autori navode da takrolimus posjeduje antioksidacijska svojstva, što je i pokazano, nakon transplantacije bubrega<sup>202</sup>. Takrolimus smanjuje razinu slobodnih radikala u tkivu jetre nakon teške ishemijske epizode, suprimira odgovor citokina, naročito IL-1 i TNF- $\alpha$ , i smanjuje migraciju neutrofila u tkiva<sup>203</sup>.

Postoji nekoliko studija u kojima su se uspoređivali različiti imunosupresivni lijekovi u odnosu na nastanak oksidacijske ozljede. Uspoređivano je davanje CNI (CsA i Tac), međutim, ni biljezi oksidacijskog stresa ni antioksidacijski kapacitet se nisu razlikovali između skupina<sup>204</sup>.



## **2. HIPOTEZA**

Parametri lipidne peroksidacije (HNE-histidinski i akrolein-lizinski konjugati) razlikovati će se između akutnog staničnog odbacivanja presatka jetre i recidiva virusne bolesti u odnosu na njihov intenzitet i mikro lokaciju. Razlika u jačini lipidne peroksidacije mogla bi potaknuti i razlike u antioksidacijskom odgovoru putem NRF2 transkripcijskog faktora za antioksidacijski odgovor.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kako bi mogli razlikovati akutno stanično odbacivanje presatka jetre od recidiva virusne bolesti određeni su sljedeći ciljevi u istraživanju:

1. Odrediti incidenciju akutnog staničnog odbacivanja presatka jetre.
2. Odrediti ulogu lipidne peroksidacije u akutnom staničnom odbacivanju.
3. Odrediti mogući mehanizam antioksidacijske zaštite kao mogućeg razlikovnog čimbenika između akutnog staničnog odbacivanja i virusne infekcije.
4. Rezultate morfološke analize i karakteristike izraženosti ispitivanih biljega usporediti sa kliničkim i laboratorijskim pokazateljima: dob, spol, etiologija bolesti, podudarnost krvne grupe i Rh faktora, MELD (protrombinsko vrijeme, ukupni bilirubin i serumski kreatinin), indeks rizika donora (DRI), stupanj odbacivanja (RAI), transaminaze u serumu, specifičnost imunosupresivnog liječenja.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. ISPITANICI

Uzorci su sakupljeni u Kliničkoj bolnici Merkur u Zagrebu uz odobrenje Etičkog povjerenstva KB Merkur (UR.BR. 03/1-3576). Istraživanje je u potpunosti usklađeno s etičkim standardom Deklaracije iz Helsinkija iz 1975. godine te njezinim modifikacijama iz 1983. godine.

Istraživanje je retrospektivnog karaktera. Pretraživanjem baza podataka Bolničkog informatičkog sustava (BIS), baze podataka i arhive Klinike za kirurgiju te Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur od 2005. do 2015. godine izdvojeno je 40 bolesnika koji su bili podvrgnuti transplantaciji jetre, te kojima su učinjene dvije biopsije jetre, „nulta” i indikacijska biopsija presatka jetre.

Ovisno o etiologiji, bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: 22 bolesnika sa cirozom uzrokovanom alkoholom (skupina EtOH) i 18 bolesnika s cirozom uzrokovanom hepatitisom C (skupina HCV).

Podaci za ovo istraživanje dobiveni su i na temelju dvije biopsije jetre, „nulte“ i indikacijske biopsije presatka:

1. „nulta” biopsija jetre donora (prije implantacije); te
2. indikacijska biopsija (nekoliko dana nakon transplantacije). Najčešća indikacija za izvođenje indikacijske biopsije bila je klinička sumnja na akutno stanično odbacivanje, primarno na temelju porasta vrijednosti transaminaza jetre u serumu i/ili kolestatskih parametara, pri čemu slikovnim metodama (najčešće ultrazvuk jetre s obojanim Dopplerom i CT angiografija) nije pokazana promjena morfologije.

U istraživanje nisu uključeni bolesnici s hepatocelularnim karcinomom (HCC), bilo da je on dijagnosticiran prije transplantacije ili naknadno makroskopskom i mikroskopskom patohistološkom analizom nativne jetre, kao i bolesnici podvrgnuti retransplantaciji jetre.

Identitet bolesnika uključenih u istraživanje zaštićen je korištenjem broja protokola biopsije za identifikaciju te je poznat samo voditelju istraživanja. Klinički i laboratorijski podaci, poznati samo voditeljici istraživanja, dobiveni su iz osobnih kartona bolesnika Klinike za kirurgiju, te anesteziološke intraoperativne liste te liste iz Jedinice intenzivnog liječenja Odjela za anesteziju, reanimaciju i intenzivno liječenje KB Merkur.

Kontrola svakog pojedinog bolesnika u svakoj skupini bila je nulta „0“ biopsija. Isto tako dvije skupine ispitanika (EtOH i HCV) služe kao kontrola jedna drugoj.

Dokazivanje konačnih produkata lipidne peroksidacije metodom imunohistokemije provedeno je na bioptičkom materijalu u Laboratoriju za oksidacijski stres Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

## 4.2. METODE

U sklopu obrade za stavljanje na listu za transplantaciju organa, bolesnici prolaze temeljitu obradu (standardna dijagnostička obrada opisana je u poglavlju Transplantacija). Sve analizirane podatke preuzela je voditeljica istraživanja iz medicinske dokumentacije ispitanika te pridružila broju protokola biopsije kako su zatim vođeni u daljnjim analizama.

U analizama podataka ovog istraživanja bili su uključeni slijedeći parametri:

Parametri primatelja: dob, spol, etiologija ciroze, visina, težina, indeks tjelesne mase (BMI- od engl. *Body mass index*), krvna grupa (KG), bodovi MELD i bodovi MELD/Na (detaljno opisano u poglavlju *Izbor bolesnika*).

Parametri donora: dob, spol, visina, težina, indeks tjelesne mase (BMI- od engl. *Body mass index*), krvna grupa (KG), uzrok smrti, vrijeme hladne ishemije (CIT- od engl. *Cold ischemia time*) i vrijeme tople ishemije (WIT- od engl. *Warm ischemia time*). Svi podaci vezani uz donora obuhvaćeni su indeksom rizika donora (DRI- od engl. *Donor risk index*, Tablica 1.). U transplantaciji organa vrijeme hladne ishemije započinje kada se donirani organ ispere i prezervira hladnom perfuzijskom otopinom i traje sve do trenutka kada organ dostiže fiziološku temperaturu prilikom procesa implantacije. Od tog trenutka teče vrijeme tople ishemije, koje završava uspostavom kirurških vaskularnih anastomoza.

Dodatni podaci i njihovo korištenje:

1. Uspoređena je i kompatibilnost primatelja i donora na temelju krvne grupe i Rh faktora te nalaz tzv. „cross-match“-a tj. serološko testiranje za utvrđivanje postojanja protutijela primatelja na eritrocite donora.
2. Laboratorijski parametri na dan uzimanja biopsija (nulte i indikacijske): leukociti (L), eritrociti (E), hemoglobin (Hgb), hematokrit (Htc), trombociti (Trc), eozinofili (Eo), protrombinsko vrijeme (PV), internacionalni omjer protrombinskog vremena (INR- od engl. *International normalized ratio*), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV), fibrinogen, kalij (K), natrij (Na), urea, kreatinin, C-reaktivni protein (CRP), ukupni bilirubin, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), gama glutamil transferaza (GGT), alkalna fosfataza (ALP), a nakon transplantacije i kolinesteraza (ChE), ukupni kolesterol te razina imunosupresije- takrolimus (Tac) ili ciklosporin (CsA).

3. Indikacijska biopsija: postojanje akutnog staničnog odbacivanja (ASO) i stupanj odbacivanja izražen kroz RAI (od engl. *Rejection activity index*).
4. Mikroskopska analiza uzoraka biopsije tkiva jetre, izvršena je od strane patologa na arhiviranom materijalu Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Merkur.

Biopsije su učinjene u skladu s pravilima aseptičnog i sterilnog rada. Nulta „0“ biopsija je klinasta biopsija presatka jetre uzeta na otvorenom preparatu prije implantacije. Indikacijska biopsija je iglena biopsija dobivena perkutano u lokalnoj infiltracijskoj anesteziji (2% lidokain) pod kontrolom ultrazvuka i uporabom automatskog bioptičkog uređaja s iglom od 16 gaugea.

Uzorci su pripremljeni i obojeni standardnim metodama. Pogledani su pod svjetlosnim mikroskopom od strane iskusnog i neovisnog patologa, specijaliziranog u području transplantacije jetre.

#### **4.2.1. STANDARDNE METODE PRIPREME PATOHISTOLOŠKOG PREPARATA**

Bioptički materijal fiksiran je u 10% puferiranom formalinu, dehidriran kroz uzlazni gradijent alkohola (70%, 96%, apsolutni etanol) te je finalno dehidriran u ksilenu. Nakon ksilena, materijal je prožet parafinom te uklopljen u parafinske kocke. Materijal je iz parafinskih kocki rezan na rezove debljine 4 µm te su rezovi stavljeni na predmetna stakla i kao takva su se koristila za bojanja. Za svako bojanje histološki rezovi na predmetnim staklima su deparafinirani u ksilenu, te rehidrirani u silaznom gradijentu alkohola (70%, apsolutni etanol, 96% i 70% te PBS).

Hemalaun-eozin bojanje (razlikovanje jezgre i citoplazme): Preparat je obojen Mayerovim hematoksilinom kroz 5-10 min (bojenje jezgre). Nakon ispiranja tekućom vodom 10-15 min i promjene boje iz crvene u plavu, nanese se 1% kiselu-alkoholna otopina eozina kroz 1-5 min (bojenje citoplazme).

Masson metoda (upotreba trostrukog bojanja za prikaz kolagena): Najprije se nanese Weigertova otopina hematoksilina obogaćena željezom kroz 10 minuta (bojanje jezgre u crno). Nakon ispiranja preparata tekućom i destiliranom vodom nanese se Biebricheva grimizna alkoholna otopina fuksina kroz 10 minuta (bojanje citoplazme i mišićnih vlakana u crveno). Nakon postupka ispiranja nanese se otopina anilinskog modrila kroz 10 minuta (bojanje kolagena u plavo).

Metoda po Gomoriju (reakcija srebra za prikaz retikulina): Preparat se tretira hematoksilinom kroz 5 minuta. Nakon ispiranja se nanese Gomorijevo bojanje kroz 10 minuta (retikulin se boji crno, a jezgra crveno). Slijedi diferencijacija bojenja upotrebom 0.2% otopine octene kiseline kroz 1 minutu.

Berlinsko modriilo (za prikaz željeza): Preparat se na 20 minuta uroni u prethodno pripremljenu otopinu jednakih djelova 5% kalijevog željenog cijanida i 5% kloridne kiseline. Nakon ispiranja destiliranom vodom nanese se otopina „Nuclear Fast Red“ otopina na 5 minuta (jezgra se boji crveno, a željezo tj. hemosiderin plavo).

Svi histološki preparati su po završetku bojanja isprani destiliranom vodom, potom dehidrirani kroz uzlazni gradijent akohola (70%, 96%, apsolutni etanol) i konačno dehidrirani u ksilenu. Uzorci su trajno uklopljeni u Kanada balzam.

#### **4.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE I ANALIZA**

Preparati su bojani metodom imunohistokemije. Analizirala se izraženost pozitiviteta, lokalizacija i intenzitet ispitivanih biljega akroleina, HNE, i NRF2.

Histološki preparati rehidrirani su na ranije opisan način. Nakon inkubacije od dvije minute u metanolu preparati su ispirani u fosfatnom puferu (PBS) 3 puta po 5 minuta, te je slijedila hibridizacija ciljnog antigena specifičnim protutijelima.

Metoda imunohistokemije vezana uz dokazivanje reaktivnog aldehida akroleina (ACR) provedena je izvornim mišjim monoklonskim protutijelima na akrolein-lizinski konjugat (pripremljenih u Laboratory of Food and Biodynamics, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan, ljubaznošću dr. K. Uchide) u razrjeđenju 1:40 te upotrebom metode En Vision. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu, preparati su inkubirani dva sata u prisutnosti primarnih protutijela na akrolein – lizinske konjugate (razrjeđenje 1:40). Potom su isprani u PBS-u 3 puta po 5 minuta, nakon čega je slijedilo blokiranje endogenih peroksidaza 3% vodikovim peroksidom 20 minuta u mraku. Nakon toga su preparati isprani u Tris fosfatnom puferu (TBS) te inkubirani 30 minuta reagensom En Vision (sekundarno protutijelo, DAKO, Danska). Nakon ponovnog ispiranja s TBS-om 3 puta po 5 minuta, akrolein-lizinski konjugati vizualizirani su dodatkom otopine 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorida (DAB, Dako), koji je kod vezanog primarnog protutijela tj. prisutnog antigena davao smeđe obojenje. Suvišak DAB isprao se destiliranom vodom. Za kontrastno bojanje koristila se otopina hemalauna. Nakon ponovnog ispiranja vodom, slijedila je dehidracija uzlaznim gradijentom akohola (70%, 96%, apsolutni etanol) i konačna dehidracija u ksilenu. Uzorci su trajno uklopljeni u Kanada balzam.

Za određivanje prisustva HNE-a u stanicama korišteno je monoklonsko protutijelo na anti-HNE-histidinski konjugat (ustupljeno ljubaznošću prof. Georga Waega, u razrjeđenju 1:10 1% BSA/PBS), koje je ostavljeno na preparatima preko noći na 4°C u vlažnoj komori. Po isteku inkubacije stanice su isprane 3 puta po 5 minuta s PBS-om, te je zatim djelovanje endogenih peroksidaza blokirano s 3% vodikovim peroksidom 20 minuta u mraku. Po isteku inkubacije preparati su isprani u TBS-u te inkubirani 30 minuta reagensom En Vision (sekundarno protutijelo, DAKO, Danska). Nakon ponovnog ispiranja s TBS-om 3 puta po 5 minuta, HNE-

histidinski konjugati vizualizirani su dodatkom otopine DAB-a (Dako), koji je kod vezanog primarnog protutijela tj. prisutnog antigena davao smeđe obojenje. Suvišak DAB-a isprao se destiliranom vodom. Za kontrastno bojanje koristila se otopina hemalauna. Nakon ponovnog ispiranja vodom, slijedila je dehidracija uzlaznim gradijentom akohola (70%, 96%, apsolutni etanol) i konačna dehidracija u ksilenu. Uzorci su trajno uklopljeni u Kanada balzam.

Za određivanje NRF2, preparati su ostavljeni u citratnom puferu pH 6.0 na temperaturi od 85 °C 30 minuta. Endogene peroksidaze inhibirale su se 3% vodikovim peroksidom tijekom 20 minuta. Nakon toga su preparati inkubirani primarnim protutijelom anti-NRF2 (ab31163, Abcam, UK; ustupljeno ljubaznošću dr.sc. Tomislava Orešića), koje je ostavljeno na stanicama preko noći na 4 °C u vlažnoj komori. Po isteku inkubacije preparati su isprani u TBS-u te inkubirani 30 minuta En Vision reagensom (sekundarno protutijelo, DAKO, Danska). Nakon ponovnog ispiranja s TBS-om 3 puta po 5 minuta, HNE- histidinski konjugati vizualizirani su dodatkom otopine DAB-a (Dako), koji je kod vezanog primarnog protutijela tj. prisutnog antigena davao smeđe obojenje. Suvišak DAB-a isprao se destiliranom vodom, uz kontrastno bojanje otopinom hemalauna. Nakon ponovnog ispiranja vodom, slijedila je dehidracija kroz uzlazni gradijent akohola (70%, 96%, apsolutni etanol) i konačna dehidracija u ksilenu. Uzorci su trajno uklopljeni u Kanada balzam.

Prisutnost akroleina, HNE-a i NRF2 u bioptičkom materijalu očitana je semikvantitativno pomoću fluorescentnog svjetlosnog mikroskopa (tip Olympus BX51 s pripadajućom digitalnom kamerom DP70 i programom za analizu slike).

Temeljne osobitosti izraženosti molekularnih meta (pozitivitet, lokalizacija i intenzitet) analizirane su u odnosu na postotak stanica s obojenjem. Očitavanje je izvršeno na najmanje 5 vidnih polja velikog povećanja 400x. Analizirana je prisutnost citoplazmatske, nuklearne ili mješane izraženosti. Intenzitet akroleina, HNE-a i NRF2 obojenja bio je zadan na slijedeći način: 0= negativno, 1+= slabo, vidljivo na povećanju 400x, 2+= srednje, vidljivo na povećanju 100x i 3+= jako, vidljivo na povećanju 40x.

### **4.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA**

Za statističku obradu dobivenih podataka primijenjene su standardne metode deskriptivne statistike za prikaz numeričkih (vrijednosnih) varijabli: aritmetička sredina, standardna pogreška aritmetičke sredine te prosjek za prikaz zbirnih vrijednosti atributivnih varijabli. Korišteni su slijedeći statistički testovi: Fisherov egzaktni test, Studentov T test, te  $\chi^2$  test i one-way ANOVA za multivarijantnu analizu parametara.

Nadalje, za analizu varijabli vezanih uz osobitosti bolesnika i laboratorijskih parametara s varijablama vezanih uz imunohistokemijsko bojanje, korištena je Spearmanova korelacija. Ona

se koristi kada između varijabli promatranog modela ne postoji linearna povezanost niti normalna distribucija.

Pri statističkoj analizi korišten je računalni program Prism GraphPad, verzija 8.0 (GraphPad Software, SAD, 2020.).

Za sve testove uzeta je razina značajnosti  $p < 0.05$ .



## 5. REZULTATI

### 5.1. ANALIZA OPĆIH PARAMETARA BOLESNIKA KOJIMA JE UČINJENA TRANSPLANTACIJA JETRE

Podaci o bolesnicima kojima je učinjena transplantacija jetre prikazani su u Tablici 11.

U istraživanje je uključeno ukupno 40 bolesnika s transplantacijom jetre, kojima su uzete nulta (u daljnjem tekstu: 0-ta) i indikacijska biopsija u istom periodu hospitalizacije. Ukupna prosječna dob bolesnika iznosila je 54 godine, u rasponu od 39 do 67 godina, a prema spolu je obuhvatila 32 muškaraca i 8 žena.

Prema etiologiji bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: 22 bolesnika s alkoholnom cirozom jetre (EtOH skupina) te 18 bolesnika s cirozom jetre uzrokovanom virusom hepatitisa C (HCV skupina).

Provedenom statističkom analizom skupine su bile usporedive obzirom na dob, spol, BMI, MELD, parametre donora (DRI, dob i BMI donora), parametre vezane uz čin transplantacije (CIT i WIT), kao i za samu incidenciju akutnog staničnog odbacivanja (ASO) (Tablica 11.).

Dijagnoza ASO potvrđena je mikroskopskom analizom bioptičkog materijala dobivenog indikacijskom biopsijom presatka jetre. Indikacijska biopsija učinjena je onog trenutka kada se postavila sumnja na ASO zbog abnormalnih vrijednosti laboratorijskih parametara (porast serumskih vrijednosti jetrenih transaminaza i/ili kolestatskih parametara) uz morfološki uredan izgled presatka (dijagnosticiran slikovnim radiološkim metodama).

Ukupna incidencija ASO u promatranom uzorku iznosila je 65% (26 od 40 bolesnika). Razvila se u 13 bolesnika u EtOH skupini (59.09%) i 13 bolesnika u HCV skupini (72.22%) s ASO. Nije utvrđena statistički značajna razlika između skupina ( $p=0.5103$ ) (Tablica 11.).

U slučaju pojave ASO, određuje se i stupanj odbacivanja (RAI). Umjereno odbacivanje dokazano je u 10 bolesnika u EtOH i u 10 bolesnika u HCV skupini. Dodatno su u svakoj skupini bila tri bolesnika u kojih je došlo do srednje teškog odbacivanja. Nije zabilježen niti jedan slučaj teškog odbacivanja (Slika 13).

Između skupina ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na stupanj odbacivanja presatka jetre ( $p=0.5103$ ) (Slika 13.). Razlike u vremenskom periodu unutar kojeg se posumnjalo na ASO (označen kao dan odbacivanja) također nisu statistički značajne ( $p=0.4280$ ) (Tablica 11.).

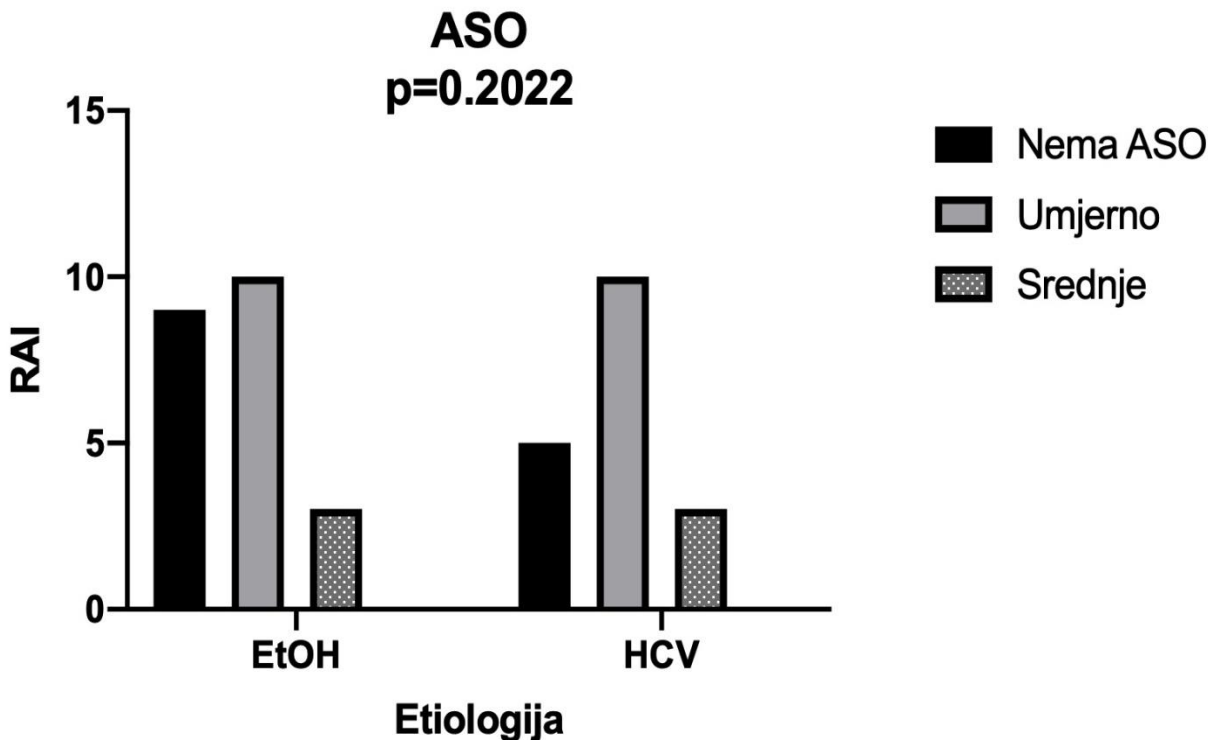
Tablica 11. Karakteristike bolesnika ovisno o etiologiji ciroze jetre

Parametri	EtOH n= 22	HCV n= 18	p vrijednost
<b>Dob, godine±SEM (raspon)</b>	54.59±1.554 (39-67)	53.78±1.805 (40-67)	0.733 <sup>a</sup>
<b>Spol, n (%) muški ženski</b>	19 (86.36) 3 (13.64)	13 (72.22) 5 (27.78)	0.4295 <sup>b</sup>
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup>±SEM (raspon)</b>	27.45±0.9371 (20.80-39.90)	26.65±0.8962 (22.00-34.30)	0.5391 <sup>a</sup>
<b>MELD, prosjek±SEM (raspon)</b>	18.82±1.541 (9-35)	17.50±1.846 (7-40)	0.5837 <sup>a</sup>
<b>CIT, minute±SEM (raspon)</b>	450.136±32.73 (219-875)	432.333±30.66 (240-641)	0.6985 <sup>a</sup>
<b>WIT, minute±SEM (raspon)</b>	35.23±2.781 (20-64)	33.11±1.850 (23-47)	0.5496 <sup>a</sup>
<b>Dob donora, godine±SEM (raspon)</b>	53.18±3.606 (18-79)	48.22±3.751 (15-68)	0.3495 <sup>a</sup>
<b>BMI donora, kg/m<sup>2</sup>±SEM (raspon)</b>	26.60±0.9217 (19.50-36.10)	27.10±0.9909 (20.10-36.80)	0.6938 <sup>a</sup>
<b>DRI, prosjek±SEM (raspon)</b>	1.632±0.08173 (0.968-2.255)	1.603±0.07739 (1.082-2.300)	0.8002 <sup>a</sup>
<b>Odbacivanje, n (%) ASO nonASO</b>	13 (59.09) 9 (40.91)	13 (72.22) 5 (27.78)	0.5103 <sup>b</sup>
<b>Dan odbacivanja, dan±SEM (raspon)</b>	27.41±9.268 (4-147)	38.67±10.63 (1-154)	0.4280 <sup>a</sup>
<b>Inicijalna imunosupresija CyA+MMF+S Tac+MMF+S</b>	13 (59.09) 9 (40.91)	16 (88.89) 2 (18.18)	0.0727 <sup>b</sup>

SEM- standardna pogreška aritmetičke sredine; BMI- Body mass index; MELD- Model for end-stage liver disease; CIT- cold ischemia time; WIT- warm ischemia time; DRI- Donor risk index; ASO- akutno stanično odbacivanje; CyA- ciklosporin; MMF – mikofenolat mofetil; S – kortikosteroid; Tac – takrolimus

a- usporedba između skupina napravljena je Studentovim t-testom

b- usporedba između skupina napravljena je Fisherovim egzaktnim testom



Slika 13. Stupanj odbacivanja (RAI) (one-way ANOVA, p=0.2022)

## 5.2. ANALIZA OPĆIH KARAKTERISTIKA IZMEĐU SKUPINE S DOKAZANIM ODBACIVANJEM (ASO) I SKUPINE BEZ ODBACIVANJA PRESATKA JETRE (nonASO)

Od ukupnog broja ispitanika (40 bolesnika), u 26 je dokazno odbacivanje presatka jetre (skupina ASO), a u 14 bolesnika nije bilo elemenata akutnog staničnog odbacivanja (skupina nonASO). Statističkom obradom podataka skupine se ne razlikuju po spolu, ali ima značajnih razlika u odnosu na dob i BMI, i u primatelja (p=0.0333; p=0.0204), i u donora (p=0.0177; p=0.0238) (Tablica 12.). Nadalje, skupine se značajno razlikuju u odnosu na vrijeme uzimanja indikacijske biopsije i postavljanja dijagnoze akutnog odbacivanja (p=0.007). Indikacijske biopsije u skupini ASO učinjene su u kraćem poslijetransplantacijskom periodu, u odnosu na skupinu nonASO.

Tablica 12. Karakteristike bolesnika s akutnim staničnim odbacivanjem

Parametri	ASO n= 26	nonASO n= 14	p vrijednost
Dob, godine±SEM (raspon)	52.42±1.448 (39-67)	57.57±1.683 (48-67)	<b>0.0333<sup>a</sup></b>
Spol, n (%) muški ženski	21 (80.77) 5 (19.23)	11 (78.57) 3 (21.43)	>0.999 <sup>b</sup>
BMI, kg/m <sup>2</sup> ±SEM (raspon)	26.00±0.6867 (20.80-34.30)	29.11±1.204 (23.60-39.90)	<b>0.0204<sup>a</sup></b>
MELD, prosjek±SEM (raspon)	18.42±1.354 (10-40)	17.86±2.299 (7-35)	0.8218 <sup>a</sup>
CIT, minute±SEM (raspon)	445.2±25.47 (238-738)	436.5±44.69 (219-875)	0.8568 <sup>a</sup>
WIT, minute±SEM (raspon)	34.42±2.116 (20-64)	34.00±3.104 (23-60)	0.9089 <sup>a</sup>
Dob donora, godine±SEM (raspon)	46.50±3.494 (15-79)	59.21±2.512 (41-69)	<b>0.0177<sup>a</sup></b>
BMI donora, kg/m <sup>2</sup> ±SEM (raspon)	25.72±0.7439 (19.50-36.80)	28.84±1.166 (22.70-36.10)	<b>0.0238<sup>a</sup></b>
DRI, prosjek±SEM (raspon)	1.566±0.07358 (0.9680-2.300)	1.718±0.08113 (1.182-2.255)	0.2014 <sup>a</sup>
Dan suspektnog odbacivanja (uzimanja biopsije), dan±SEM (raspon)	16.08±3.268 (1-64)	62.93±16.32 (1-154)	<b>0.0007<sup>a</sup></b>
Inicijalna imunosupresija CyA+MMF+S Tac+MMF+S	19 (73.08) 7 (26.92)	9 (64.29) 5 (35.71)	0.7201 <sup>b</sup>
KG kompatibilnost, n (%) da ne	15 (57.69) 11 (42.31)	8 (57.14) 6 (42.86)	>0.999 <sup>b</sup>
Kompatibilnost u odnosu na spol, n (%) da ne	16 (61.54) 10 (38.46)	12 (85.71) 2 (14.29)	0.1570 <sup>b</sup>

SEM- standardna pogreška aritmetičke sredine; BMI- Body mass index; MELD- Model for end-stage liver disease; CIT- cold ischemia time; WIT- warm ischemia time; DRI- Donor risk index; ASO- akutno stanično odbacivanje; CyA- ciklosporin; MMF – mikofenolat mofetil; S – kortikosteroid; Tac – takrolimus; KG- krvna grupa a- usporedba između skupina napravljena je Studentovim t-testom

b- usporedba između skupina napravljena je Fisherovim egzaktnim testom

Prilikom transplantacije jetre, načelno se poštuje pravilo kompatibilnosti u odnosu na krvne grupame. Međutim, ponekad se zbog hitnosti postupka uslijed rapidnog pogoršanja stanja bolesnika, ovaj princip ne slijedi. U skupini ASO 11 bolesnik nije imalo kompatibilnu krvnu grupu s donorom. U skupini nonASO takvih je bolesnika bilo šest.

Dodatno se analizirala i kompatibilnost u odnosu na spol donora i primatelja. Iako to nije uvjet koji se mora zadovoljiti prilikom alokacije organa, pretpostavlja se da bi nepodudarnost mogla imati određene nepovoljne učinke na tijek liječenja bolesnika. Nepodudarnost prema spolu postojala je i u skupini ASO (10 bolesnika), i u skupini nonASO (dva bolesnika). Razlika nije statistički značajna (Tablica 12.).

Skupine su, u odnosu na spol donora i primatelja, dodatno raščlanjene: M-M (muški donor-muški primatelj, ASO: 14 bolesnika; nonASO: 9 bolesnika), M-F (muški donor-ženski primatelj, ASO: 4 bolesnika; nonASO: 0), F-F (ženski donor-ženski primatelj, ASO: dvije bolesnice; nonASO: tri bolesnice) i konačno, F-M (ženski donor-muški primatelj, ASO: šest bolesnika; nonASO: dva bolesnika). Upotrebom testa  $\chi^2$  nije pokazana statistički značajna razlika između skupina ( $p=0.2559$ ).

Zaključno, statističkom analizom podataka koji se smatraju mogućim rizicima za odbacivanje, nije dokazana statistički značajna razlika. Shodno tome, u ovom se istraživanju nepostojanje nekompatibilnost u odnosu na krvne grupe i spol ne može se smatrati značajnim čimbenikom rizika u odnosu na odbacivanje presatka jetre.

### **5.3. ANALIZA LABORATORIJSKIH PARAMETARA IZMEĐU SKUPINA ASO i nonASO**

Analizirani su svi dostupni laboratorijski podaci sakupljeni u dva vremenska razdoblja. Prvi prilikom hospitalizacije, na dan kada je učinjena transplantacija i uzeta “nulta” biopsija jetre, a drugi na dan kada se posumnjalo na ASO, neposredno prije uzimanja indikacijske biopsije.

Od laboratorijskih pretraga učinjene su kompletna krvna slika (L, E, Hgb, Htc, Trc), koagulacijski profil (PV, APTV, INR, fibrinogen), biokemijska analiza seruma (urea, kreatinin, glukoza, CRP, ukupni bilirubin, AST, ALT, GGT, ALP, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, kolinesteraza, kolesterol) te koncentracija imunosupresivnih lijekova (ciklosporin ili takrolimus) u serumu.

Uspoređivani su parametri između ASO i nonASO skupine. Jedina statistički značajna razlika ( $p=0.0370$ ) dokazana je u odnosu na broj leukocita u indikacijskoj biopsiji, koja je u ASO skupini bolesnika bila značajno viša u odnosu na bolesnike u skupini nonASO (ASO  $7.918 \pm 0.7889$ ; nonASO  $5.044 \pm 1.065$ ;  $p=0.0370$ ).

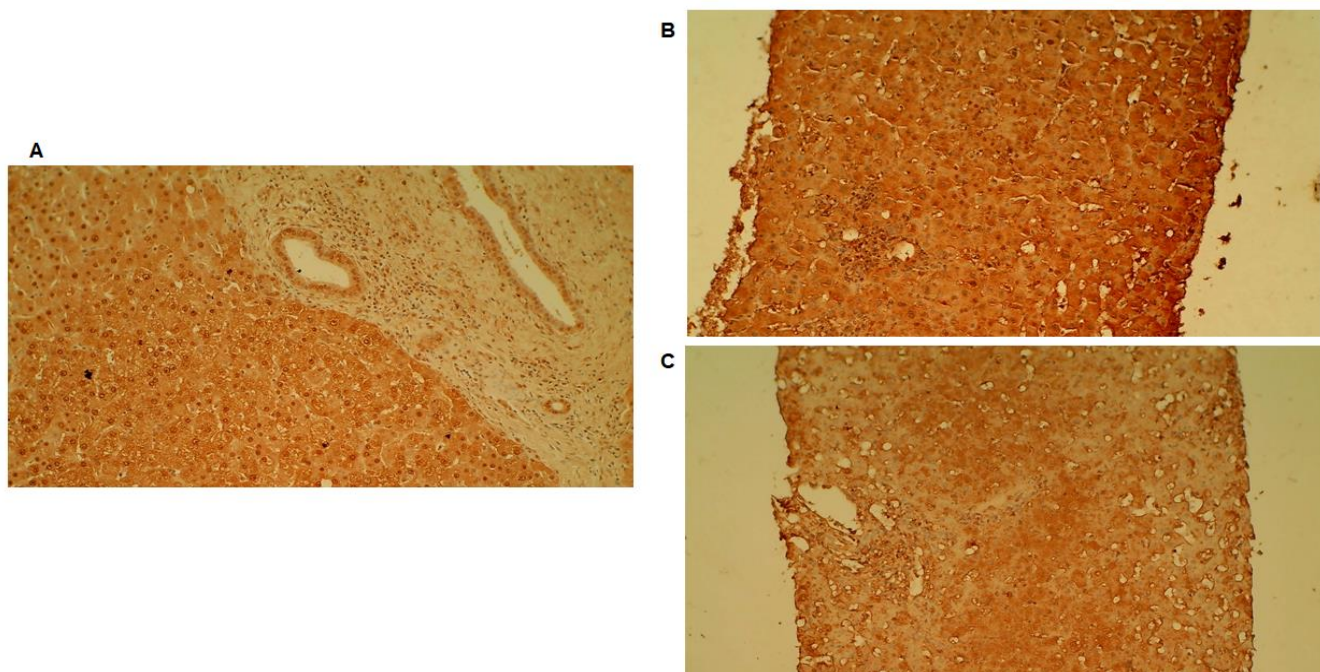
Razlike u preostalim navedenim parametrima nisu se statistički značajno razlikovale između skupina.

#### 5.4. IZRAŽAJNOST AKROLEINA, HNE-a i NRF2 U ODNOSU NA VRIJEME UZIMANJA BIOPSIJA (NULTA vs. INDIKACIJSKA)

U svih 40 bolesnika su učinjene dvije uzastopne biopsije jetre: nulta i indikacijska biopsija. Metodom imunohistokemije dokazivala se reaktivnost za ACR, HNE i transkripcijski čimbenik NRF2. HNE, ACR i NRF2 analizirani su kao postoci pozitivnih citoplazmi i pozitivnih jezgara. Čimbenik transkripcije NRF2 se normalno nalazi u citoplazmi, a aktivacijom oksidacijskim stresom translocira se u jezgru. Za napomenuti je kako nekoliko biopsija nedostaje. Uglavnom se radi o indikacijskim biopsijama u skupini EtOH: 2 biopsije za akrolein, 1 za HNE i 2 za NRF2. Najvjerojatniji razlozi nedostatka biopsije su tehničke prirode, budući da se radi o iglenoj biopsiji kojom se dobije mali cilindar tkiva (materijal je veličine 2.2 do 2.5 mm).

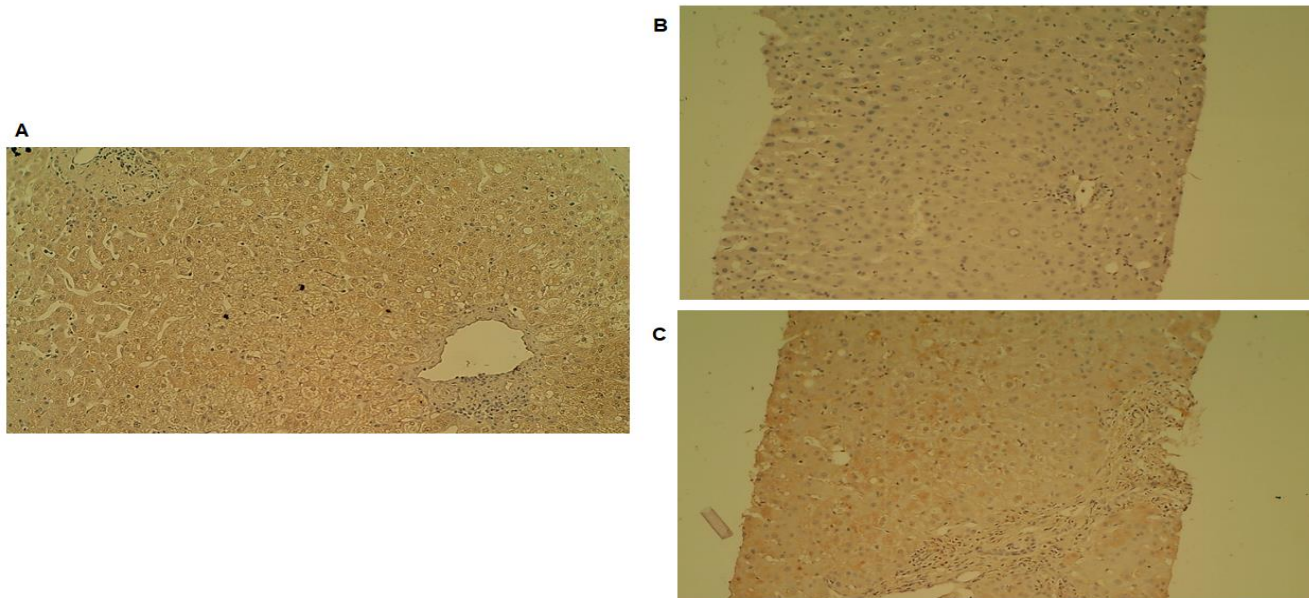
Analizirane su karakteristike izraženosti pozitiviteta, lokalizacije i intenziteta ispitivanih parametara akroleina, HNE, i NRF2 između nulte i indikacijske biopsije svih bolesnika.

Reprezentativne slike bojanja metodom imunohistokemije na akrolein-lizinske konjugate nalaze se na Slici 14., na HNE-histidinske konjugate na Slici 15.. Pozitivna reakcija na NRF2 prikazana je na Slici 16.

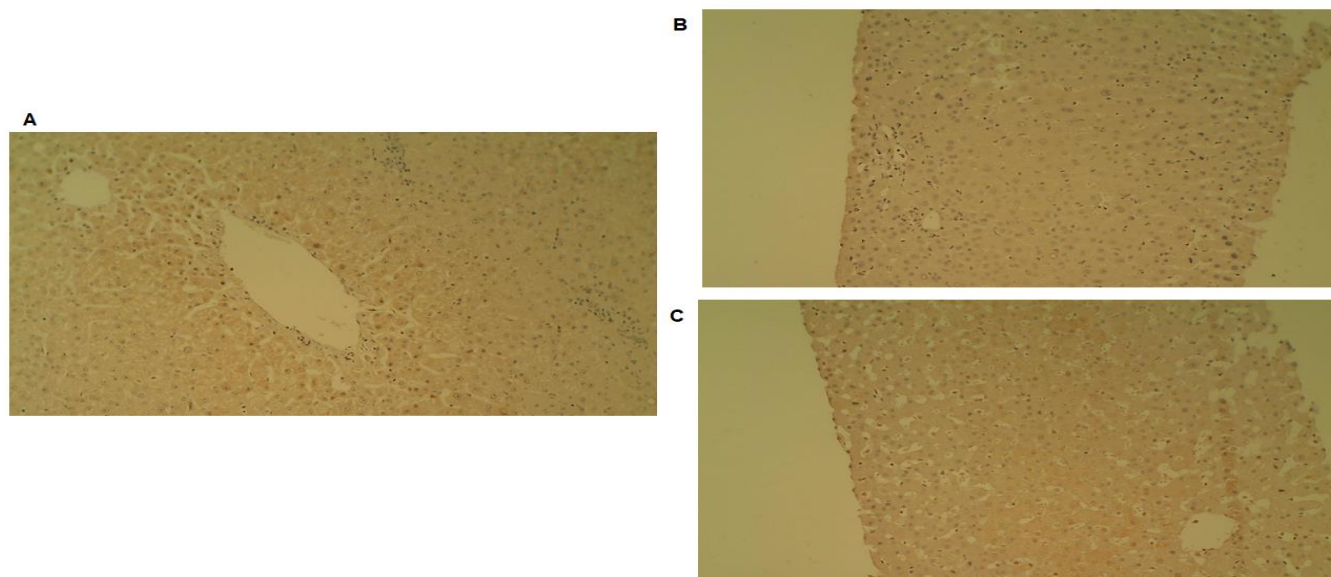


Slika 14. Akrolein-lizinski konjugati u nultoj i indikacijskoj biopsiji presatka jetre, reprezentativne slike. A) nulta biopsija (100x); B) indikacijska biopsija bolesnika u skupini EtOH (100x); C) indikacijska biopsija bolesnika u skupini HCV (100x).





Slika 15. HNE-histidinski konjugati u nultoj i indikacijskoj biopsiji presatka jetre, reprezentativne slike. A) nulta biopsija (100x); B) indikacijska biopsija bolesnika u skupini EtOH (100x); C) indikacijska biopsija bolesnika u skupini HCV (100x).



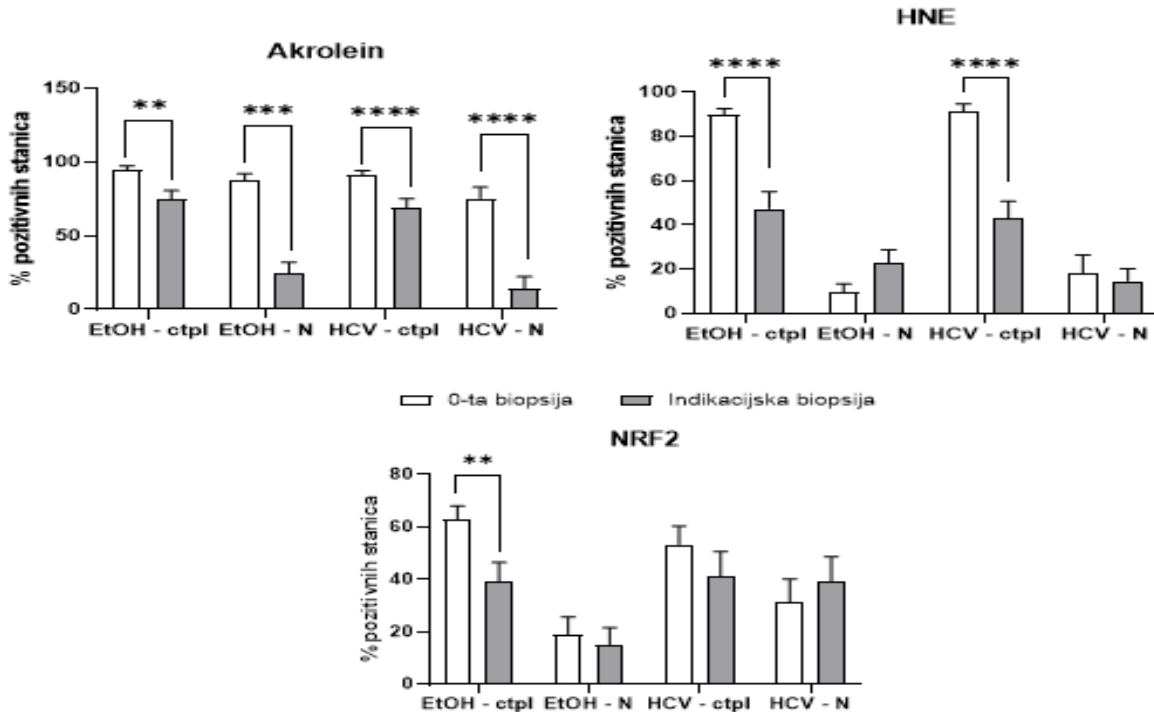
Slika 16. NRF2 u nultoj i indikacijskoj biopsiji presatka jetre, reprezentativne slike. A) nulta biopsija (100x); B) indikacijska biopsija bolesnika u skupini EtOH (100x); C) indikacijska biopsija bolesnika u skupini HCV (100x).

### 5.4.1. Hepatociti

Usporedbom izražaja akroleina u nultoj i indikacijskoj biopsiji, u obje je skupine bolesnika prikazan njegov snažniji izražaj (i u citoplazmi i u jezgri), u nultoj biopsiji (Slika 17.). U skupini EtOH je pokazana značajna razlika izražaja s obzirom na jačinu signala u citoplazmi (nulta: indikacijska;  $p=0.018$ ), a značajnost razlike bila je još veća u odnosu na jačinu signala u jezgri ( $p<0.001$ ). Slična situacija bila je i u skupini HCV, u kojoj značajnost razlike izraženosti akroleina u citoplazmi iznosi  $p=0.0006$ , a u jezgri  $p<0.0001$ . Međutim, ako se izražaj akroleina uspoređuje između ove dvije skupine bolesnika (EtOH i HCV), statistički značajne razlike u izražaju akroleina u nultoj i indikacijskoj biopsiji nema.

Izražaj HNE u jezgrama hepatocita nije značajno različit između EtOH i HCV skupine bolesnika. Međutim, u obje skupine postoji statistički značajna razlika između nulte i indikacijske biopsije u citoplazmi hepatocita (skupina EtOH:  $p<0.0001$ ; skupina HCV:  $p<0.0001$ ). Kao i u slučaju akroleina, ne postoji statistički značajna razlika između skupina EtOH i HCV, niti u nultoj, niti u indikacijskoj biopsiji.

Statistički značajna razlika izraženosti NRF2 između nultih i indikacijskih biopsija pokazana je samo u skupini EtOH, ali samo u slučaju smještaja signala u citoplazmi ( $p=0.0065$ ). S obzirom na izražaj NRF2, ne postoji statistički značajna razlika između nultih i indikacijskih biopsija između skupina.



Slika 17. Razlike u izraženosti ACR, HNE i NRF2 u hepatocitima nulte i indikacijske biopsije, u odnosu na skupine; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ; \*\*\*\* $p<0.0001$

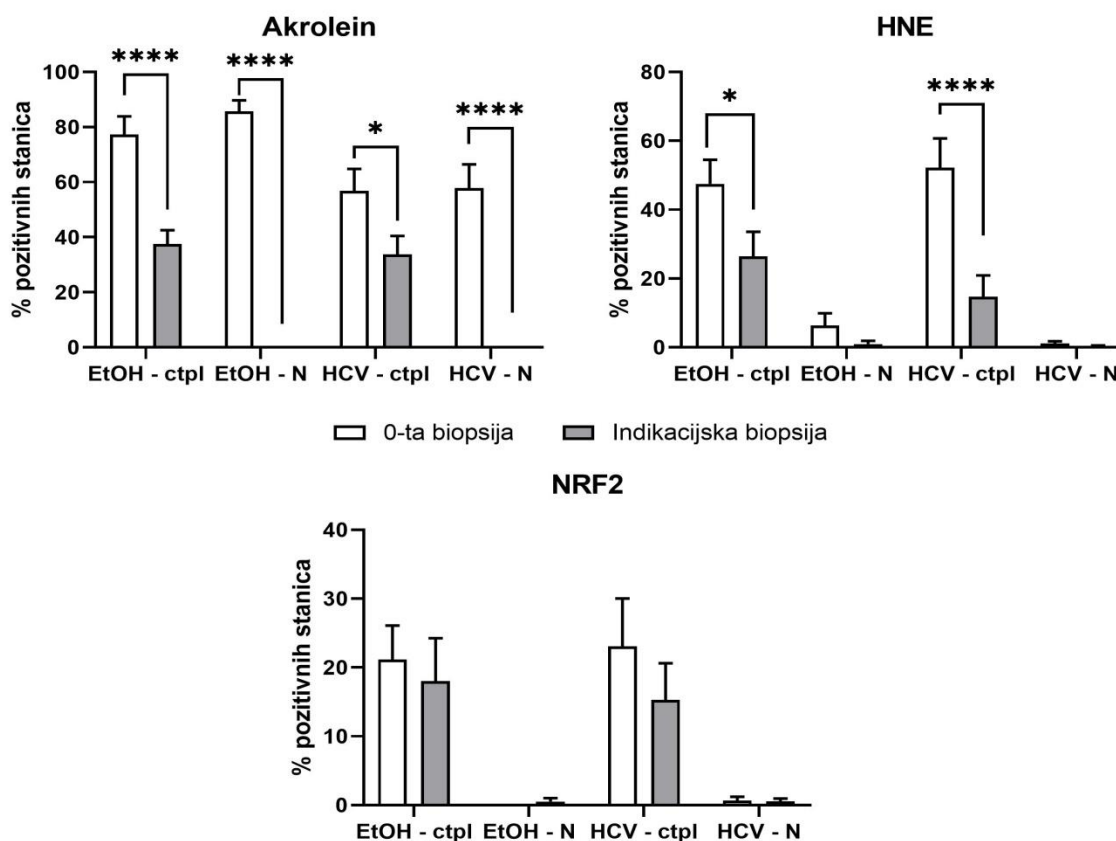


### 5.4.2. Epitel žučnih vodova

Na Slici 18. prikazana je razlika izraženosti akroleina, HNE-a i NRF2 u citoplazmi i jezgri epitela žučnih vodova u nultim i indikacijskim biopsijama, u odnosu na etiopatogenezu primarne bolesti. Kao i u hepatocitima, značajna razlika izražaja akroleina i u citoplazmi, i jezgri, postoji u obje skupine bolesnika (citoplazma: EtOH  $p < 0.0001$ , HCV:  $p = 0.0169$ ; jezgra obje skupine  $p < 0.0001$ ). Ne postoji statistički značajna razlika između skupina.

Izražaj HNE u epitelu žučnih vodova je statistički značajno različit u citoplazmama obje promatrane skupine (EtOH  $p = 0.0408$ ; HCV  $p < 0.0001$ ), dok u jezgri nije zabilježena značajna razlika između nulte i indikacijske biopsije. Između skupina nema statistički značajne razlike.

Za NRF2 nema značajne razlike u pozitivitetu ni u citoplazmi ni u jezgri u obje promatrane skupine.

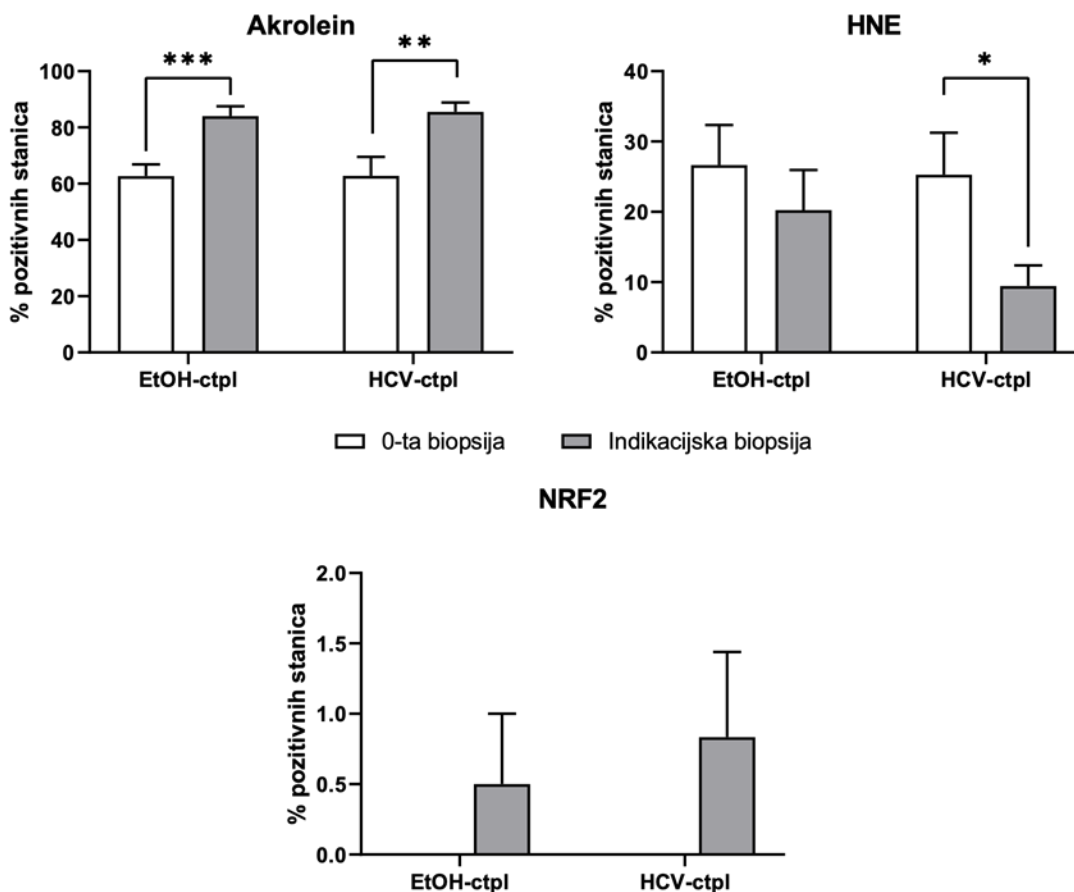


Slika 18. Razlike u izraženosti ACR, HNE i NRF2 u epitelu žučnih vodova nulte i indikacijske biopsije, u odnosu na skupine; \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$

### 5.4.3. Krvne žile

U stanicama endotela krvnih žila jetre niti jedan od biljega nije prisutan u jezgrama stanica (Slika 19). Akrolein je značajno povišen u citoplazmi stanica, u obje skupine

( $p=0.0004$  za EtOH skupinu i  $p=0.005$  za HCV skupinu). HNE je značajno snižen u indikacijskim biopsijama u skupini HCV ( $p=0.023$ ), dok u skupni EtOH nije značajno promijenjen. Zanimljivo, NRF2 pozitivitet zabilježen je samo u citoplazmi u indikacijskim biopsijama, dok ga se u nultoj biopsiji uopće ne detektira.

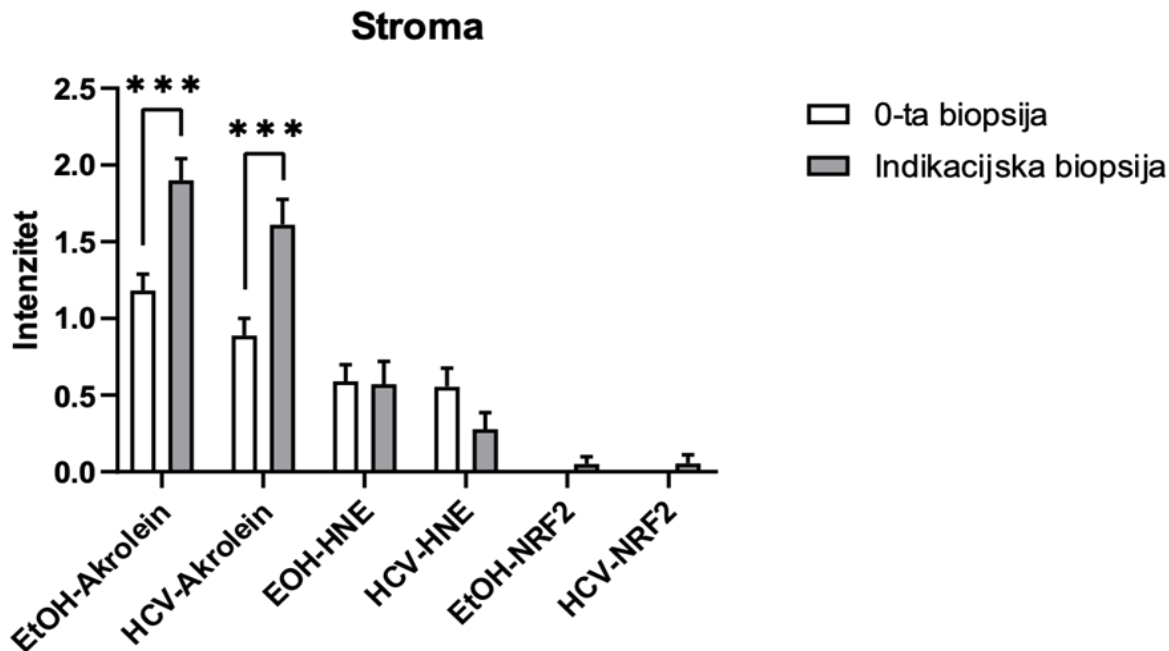


Slika 19. Razlike u izraženosti ACR, HNE i NRF2 u krvnim žilama jetre nulte i indikacijske biopsije, u odnosu na skupine; \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$

#### 5.4.4. Stroma

U stromalnim stanicama jetre (Slika 20.) statistički značajno povišenje intenziteta u indikacijskoj biopsiji nalazi se samo za akrolein u obje promatrane skupine ( $p=0.0002$  za EtOH skupinu i  $p=0.0009$  za HCV skupinu). U biopsijama za HNE i NRF2 intenziteti bojanja nisu pokazali statistički značajnije razlike između nulte i indikacijske biopsije u obje promatrane skupine.

Dodatno je za napomenuti kako je pozitivitet NRF2 bio prisutan u polimorfonuklearnim neutrofilima i Kupfferovim stanicama u svim nultim i indikacijskim biopsijama u obje promatrane skupine.

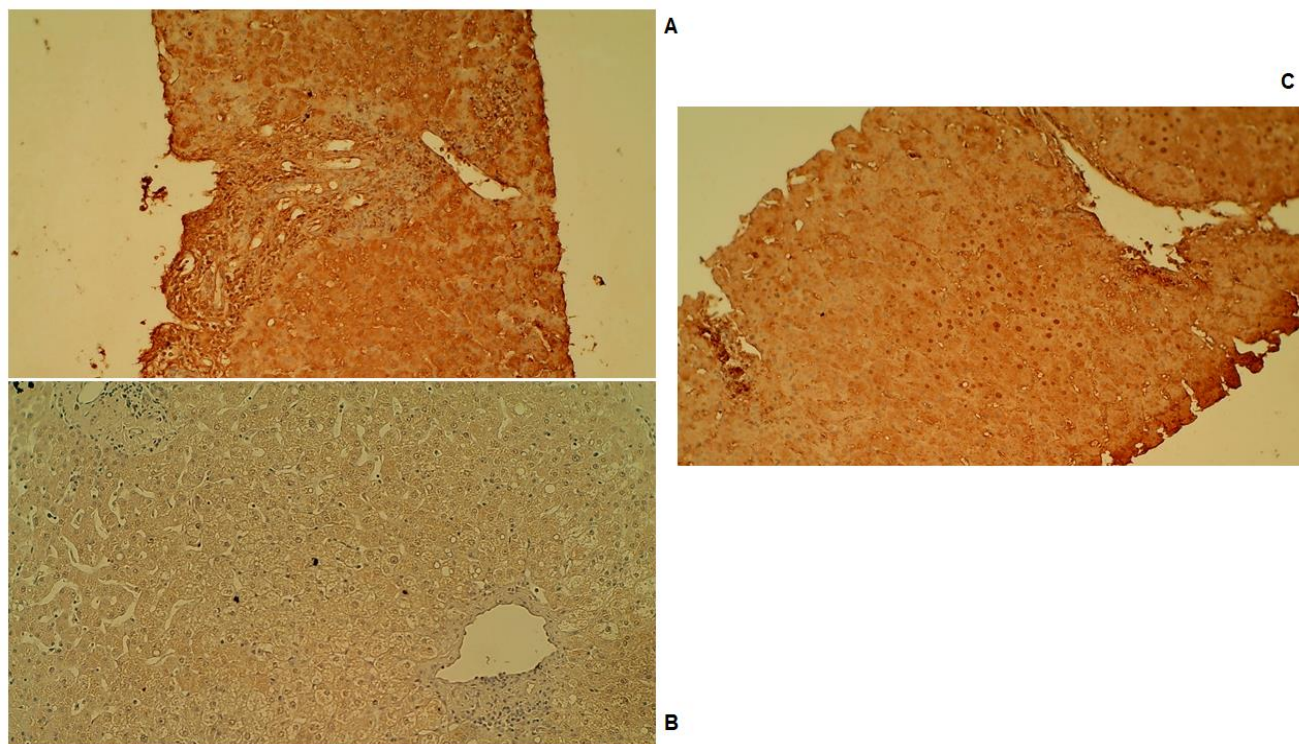


Slika 20. Razlike u izraženosti ACR, HNE i NRF2 u stromi jetre nulte i indikacijske biopsije, u odnosu na skupine; \*\*\*p<0.001

### 5.5. ANALIZA AKROLEINA, HNE-a i NRF2 U ODNOSU NA ODBACIVANJE PRESATKA JETRE (ASO vs. nonASO)

Kako bi se odredila uloga akroleina, HNE-a i NRF2 u odbacivanju presatka jetre te o mogućoj ovisnosti o etiologiji, provedena je dodatna analiza između nulte i indikacijske biopsije u odnosu na prisutnost/odsutnost akutnog staničnog odbacivanja (ASO). U skupini s ASO bilo je 26 bolesnika (13 bolesnika u obje podskupine) i 14 bolesnika u nonASO skupini (9 u EtOH i 5 u HCV skupini).

Reprezentativne slike imunohistokemijskih bojanja na akrolein-lizinske i HNE-histidinske konjugate u bolesnika s i bez ASO nalaze se na Slici 21.



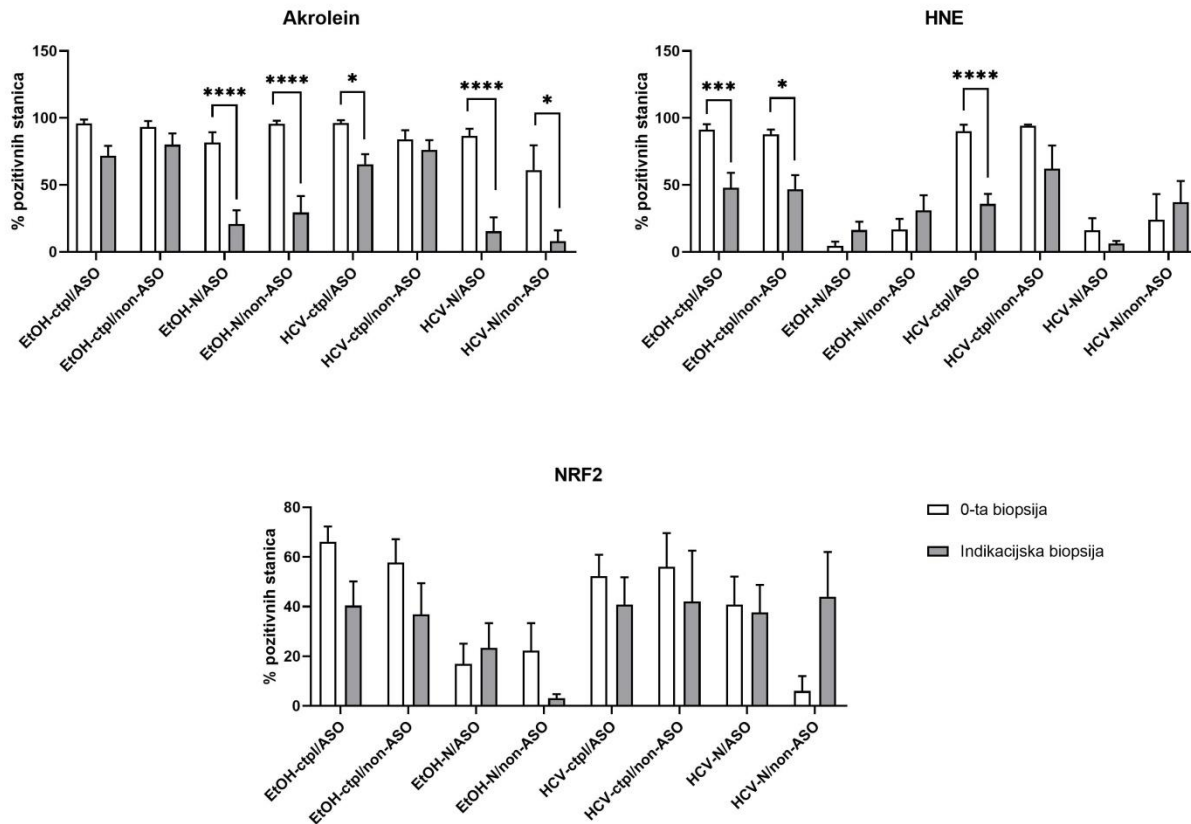
Slika 21. Konjugati u indikacijskim biopsijama presatka jetre, reprezentativne slike. A) indikacijska biopsija bolesnika s ASO (prisutne portalna upala s infiltratom te oštećenje i vakuolizacija žučnog epitela) detektirano preko akrolein-lizinskih konjugata (100x); B) indikacijska biopsija bolesnika s ASO detektirano preko HNE-histidinskih konjugata (100x); C) indikacijska biopsija bolesnika bez ASO prikazano preko akrolein-lizinskih konjugata (100x).

### 5.5.1. Hepatociti

U citoplazmama hepatocita postoji izrazita prisutnost akroleina u nultoj biopsiji, bez obzira na ASO i na etiologiju. Međutim, razlika između nulte i indikacijske biopsije statistički je značajna kod HCV/ASO skupine ( $p=0.021$ ). U jezgrama je akrolein izražen u nultoj biopsiji, međutim dolazi do značajnog pada kod ASO i nonASO, i u EtOH i u HCV podskupini (EtOH/ASO, HCV/ASO i EtOH/nonASO  $p<0.0001$ , a HCV/nonASO  $p=0.011$ ).

Za razliku od akroleina, HNE je značajno snižen u citoplazmama u indikacijskim biopsijama u EtOH/ASO skupini ( $p=0.0008$ ), EtOH/nonASO ( $p=0.010$ ) te u HCV/ASO skupini ( $p<0.0001$ ).

Biopsije za NRF2 signalni put u hepatocitima nisu dale značajne razlike u pozitivitetu između promatranih skupina (Slika 22.).



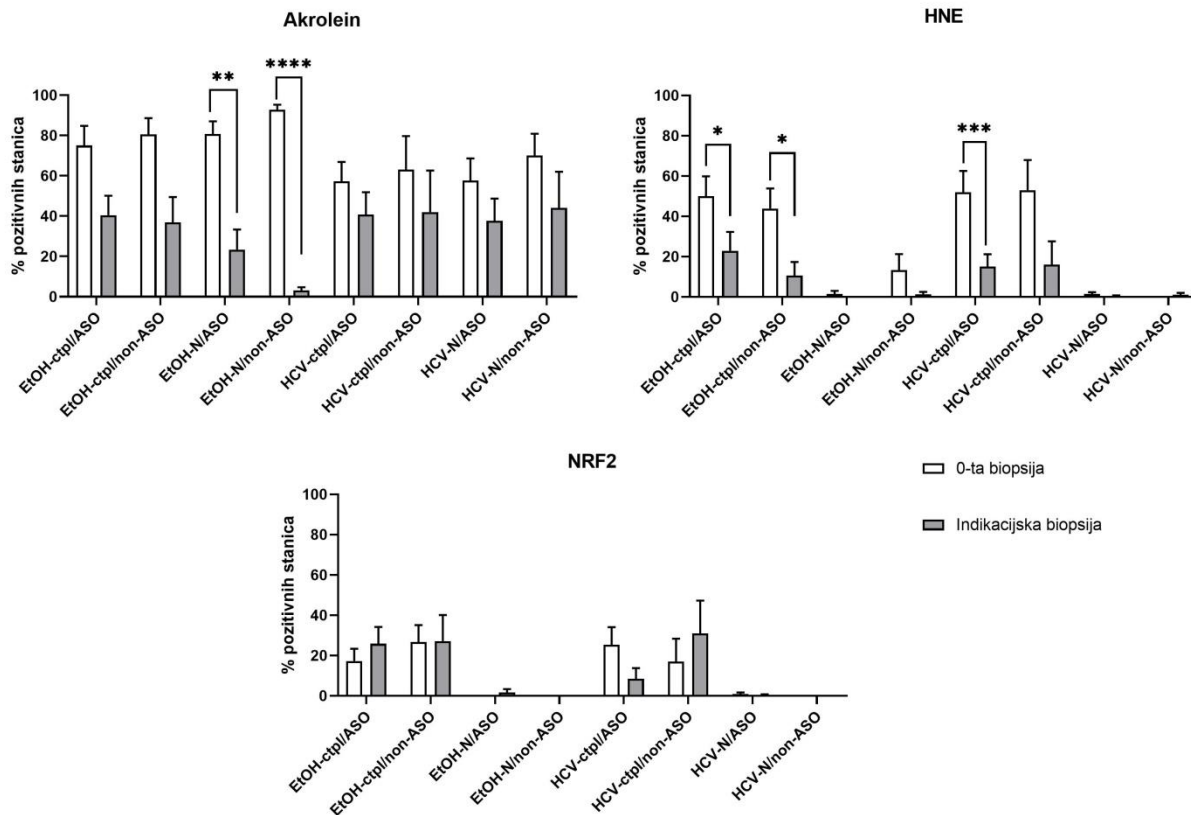
Slika 22. Razlike u izraženosti ACR, HNE i NRF2 signalnog puta u hepatocitima nulte i indikacijske biopsije, u odnosu na skupine sa i bez ASO; \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$

### 5.5.2. Epitel žučnih vodova

Na slici 23. prikazana je izraženost akroleina, HNE-a i NRF2 u epitelu žučnih vodova u odnosu na odbacivanje presatka jetre. Akrolein je značajno snižen u jezgrama kod indikacijskih biopsija u skupinama EtOH/ASO i EtOH/nonASO ( $p=0.002$  i  $p < 0.0001$ ), dok među citoplazmama epitela žučnih vodova nema statistički značajne razlike.

HNE je značajno snižen u citoplazmama indikacijskih biopsija kod EtOH/ASO, EtOH/nonASO i HCV/ASO (redom  $p=0.024$ ,  $p=0.024$  i  $p=0.001$ ). Kod jezgri epitela žučnih vodova nema statistički značajne razlike.

NRF2 se nalazi u citoplazmama svih skupina, ali bez značajne razlike, dok se u jezgrama uopće ne nalazi.



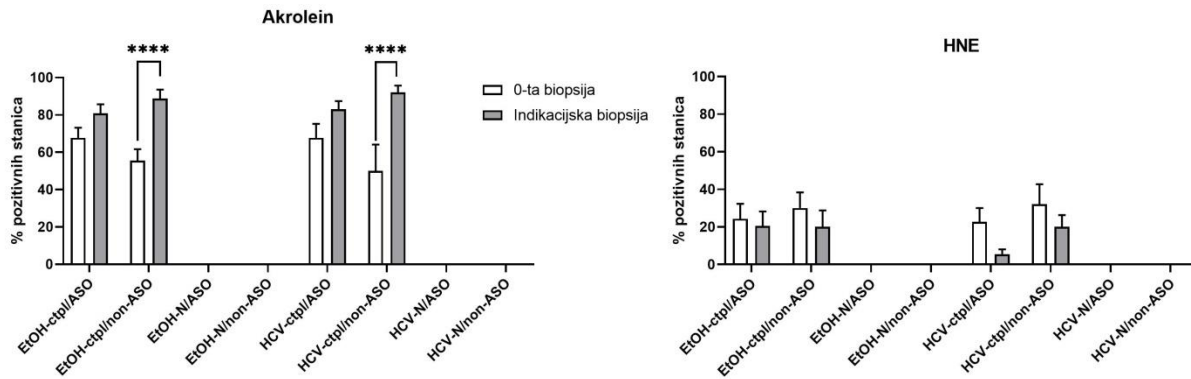
Slika 23. Razlike u izraženosti ACR, HNE i NRF2 signalnog puta u epitelu žučnih vodova nulte i indikacijske biopsije, u odnosu na skupine sa i bez ASO; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$

### 5.5.3. Krvne žile

U stanicama endotela krvnih žila jetre (Slika 24.) značajno povećanje akroleina u indikacijskim biopsijama vidi se u citoplazmi EtOH/nonASO i HCV/nonASO (za obje skupine  $p < 0.0001$ ). Akrolein se ne nalazi u jezgri stanica endotela krvnih žila, kao ni HNE.

HNE se nalazi u citoplazmi svih skupina no ne dolazi do značajne promjene u indikacijskoj biopsiji.

Zanimljivo, NRF2 nije detektiran ni u jezgri ni u citoplazmi stanica endotela krvnih žila te stoga nije ni prikazan na slici.

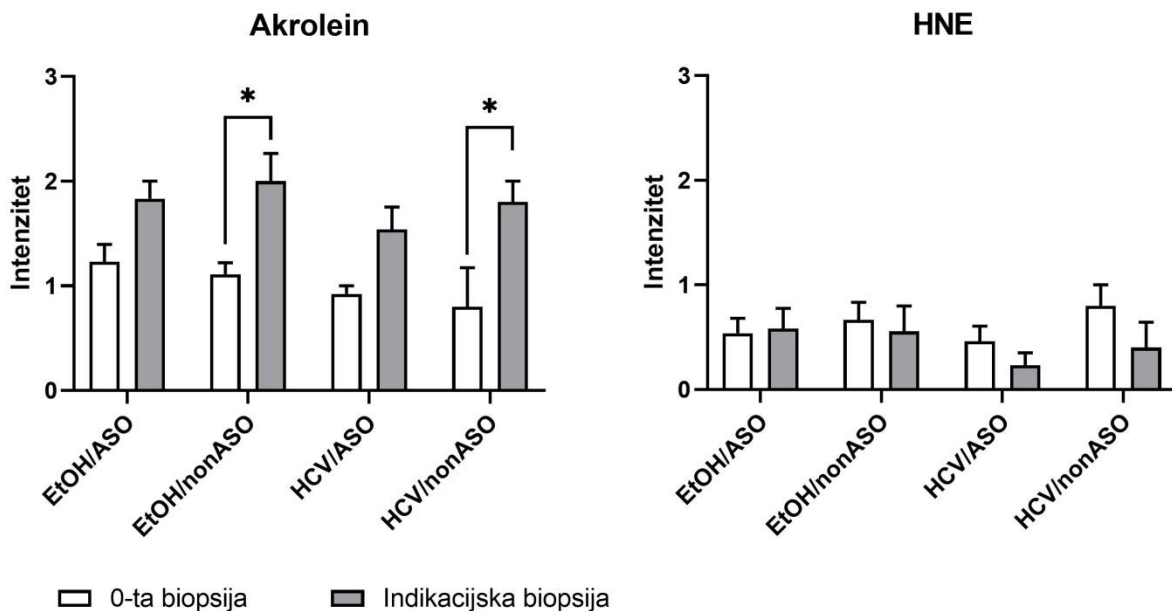


Slika 24. Razlike u izraženosti ACR, HNE i NRF2 signalnog puta u krvnim žilama jetre nulte i indikacijske biopsije, u odnosu na skupine sa i bez ASO; \*\*\*\* $p < 0.0001$

### 5.5.4. Stroma

U stromalnim stanicama jetre (Slika 25.) značajno povećanje intenziteta akroleina nalazi se u skupinama EtOH/nonASO i HCV/nonASO (redom  $p=0.014$  i  $p=0.015$ ) u indikacijskim biopsijama.

Za HNE nije detektirana značajnija promjena intenziteta pozitiviteta, dok se NRF2 ne nalazi ni u jezgri ni u citoplazmi pa je iz tog razloga on izostavljen iz prikaza.



Slika 25. Razlike u izraženosti ACR, HNE i NRF2 signalnog puta u stromi jetre nulte i indikacijske biopsije, u odnosu na skupine sa i bez ASO; \* $p < 0.05$



## 5.6. KORELACIJE IZMEĐU OPĆIH VARIJABLI BOLESNIKA, LABORATORIJSKIH VRIJEDNOSTI I IMUNOHISTOKEMIJSKIH BILJEGA

Korelacija među pojedinim parametrima utvrđena je Spearmanovom korelacijom. Snaga korelacije određena je koeficijentom  $\rho$  i to na slijedeći način: 0-0.299 slaba, 0.3-0.599 umjerena, 0.6-0.899 snažna i  $>0.9$  veoma snažna korelacija.

Značajne pozitivne korelacijske koeficijente ( $\rho$  uz  $p < 0.05$ ) imali su parovi ispitivanih varijabli s dokazanim usporednim rastom.

Značajne negativne korelacijske koeficijente (uz  $p < 0.05$ ) imali su parovi ispitivanih varijabli u kojima se rastom jedne varijable, vrijednost druge varijable smanjivala.

Za parove varijabli s  $p > 0.05$  nije nađena statistički značajna korelacija između ispitivanih varijabli, stoga su one izostavljene iz tabelarnog prikaza.

Detaljnou analizom pronađene su već do sad dobro poznate i opisane korelacije stoga su one izostavljene u prikazu. Najbolji primjeri su: MELD veoma snažno korelira s vrijednostima bilirubina, kreatinina i koagulacijskim parametrima jer su oni dio formule za izračunavanje MELD-a, vrijednost uree prati vrijednost kreatinina, broj eritrocita snažno korelira s vrijednosti hemoglobina kao i ASO i sa stupnjem odbacivanja (RAI). Što se tiče imunohistokemijskih parametara, pozitivitet ispitivanih parametara snažno korelira s intenzitetom ekspresiranosti kako u nultoj tako i u indikacijskoj biopsiji.

Ostale značajne korelacije pojedinih parametara prikazane su u Tablicama 13., 14., 15. i 16.

Zasebno su prikazani parametri koji su u pozitivnoj korelaciji i parametri koji su u negativnoj korelaciji.

Tablica 13. Pozitivna korelacija općih bolesnikovih parametara i laboratorijskih parametara (Spearmanova korelacija)

Korelirani parametri			
Parametar 1	Parametar 2	Koeficijent korelacije	p
Etiologija	AST nulta	0,342	0,030
Etiologija	ALT nulta	0,418	0,007
Etiologija	NRF2 indik hepatociti jezgra	0,393	0,014
Dob primatelja	ASO	0,339	0,032
Dob primatelja	ACR indik žučni epitel citoplazma	0,401	0,012
BMI primatelja	ASO	0,350	0,026
Dob donora	ASO	0,364	0,021



Dob donora	HNE indik hepatociti jezgra	0,416	0,008
Spol donora	HNE indik žučni epitel jezgra	0,329	0,041
BMI donora	ASO	0,323	0,042
BMI donora	NRF2 indik žučni epitel citoplazma	0,358	0,027
CIT	NRF2 nulta hepatociti jezgra	0,330	0,037
KG kompatibilnost	ACR indik hepatociti citoplazma	0,370	0,022
Spolna kompatibilnost	HNE indik žučni epitel jezgra	0,349	0,029
ASO	Dan odbacivanja	0,384	0,014
ASO	ACR indik žučni epitel citoplazma	0,371	0,021
ASO	HNE indik hepatociti jezgra	0,323	0,044
RAI	HNE nulta hepatociti citoplazma	0,321	0,043
RAI	HNE indik žučni epitel jezgra	0,373	0,019
Dan odbacivanja	HNE nulta hepatociti jezgra	0,439	0,004
urea nulta	HNE nulta žučni epitel jezgra	0,390	0,012
kreatinin nulta	HNE nulta žučni epitel jezgra	0,362	0,021
GGT nulta	ACR nulta krvne žile citoplazma	0,439	0,004
ALP nulta	ACR nulta krvne žile citoplazma	0,382	0,014
urea indik	ACR indik hepatociti citoplazma	0,340	0,036
urea indik	ACR indik stroma	0,326	0,045
kreatinin indik	HNE nulta žučni epitel jezgra	0,369	0,019
AST indik	ChE	0,321	0,043
AST indik	kolesterol	0,326	0,039
ALT indik	ChE	0,423	0,006

Tablica 14. Negativna korelacija općih bolesnikovih parametara i laboratorijskih parametara (Spearmanova korelacija)

Korelirani parametri			
Parametar 1	Parametar 2	Koeficijent korelacije	p
Etiologija	Tacrolimus	-0,343	0,030
Etiologija	ACR nulta žučni epitel citoplazma	-0,361	0,022
Etiologija	ACR nulta žučni epitel jezgra	-0,392	0,012
BMI primatelja	RAI	-0,361	0,022
BMI primatelja	HNE indik žučni epitel citoplazma	-0,343	0,032
BMI primatelja	HNE indik žučni epitel jezgra	-0,362	0,023
BMI primatelja	NRF2 nulta hepatociti citoplazma	-0,384	0,014
BMI primatelja	NRF2 indik hepatociti citoplazma	-0,326	0,046
BMI primatelja	NRF2 indik žučni epitel citoplazma	-0,342	0,035
Dob donora	RAI	-0,365	0,020
WIT	ACR indik krvne žile citoplazma	-0,351	0,030
WIT	NRF2 nulta hepatociti citoplazma	-0,314	0,048
WIT	NRF2 nulta žučni epitel citoplazma	-0,374	0,017
WIT	NRF2 indik hepatociti citoplazma	-0,328	0,044
Spolna kompatibilnost	ACR indik stroma	-0,444	0,005
RAI	kreatinin indik	-0,334	0,035
Dan odbacivanja	L indik	-0,524	0,0005
Dan odbacivanja	bilirubin uk indik	-0,528	0,0004
Dan odbacivanja	AST	-0,338	0,003
bilirubin konj nulta	HNE indik hepatociti jezgra	-0,612	0,003

bilirubin uk nulta	ACR indik žučni epitel citoplazma	-0,395	0,014
bilirubin uk nulta	HNE nulta hepatociti jezgra	-0,332	0,036
GGT nulta	ASO	-0,343	0,030
L indik	ACR indik hepatociti citoplazma	-0,334	0,040
L indik	HNE indik hepatociti citoplazma	-0,357	0,025
L indik	NRF2 nulta žučni epitel citoplazma	-0,333	0,035
AST indik	ACR indik žučni epitel citoplazma	-0,331	0,042

Tablica 15. Pozitivna korelacija imunohistokemijskih parametara (Spearmanova korelacija)

<b>Korelirani parametri</b>			
<b>Parametar 1</b>	<b>Parametar 2</b>	<b>Koeficijent korelacije</b>	<b>p</b>
ACR nulta hepatociti citoplazma	ACR nulta hepatociti jezgra	0,527	0,0004
ACR nulta hepatociti jezgra	ACR nulta žučni epitel jezgra	0,451	0,003
ACR nulta hepatociti jezgra	ACR nulta krvne žile citoplazma	0,331	0,036
ACR nulta žučni epitel citoplazma	ACR nulta žučni epitel jezgra	0,680	0,000001
ACR nulta žučni epitel citoplazma	ACR nulta krvne žile citoplazma	0,508	0,0008
ACR nulta žučni epitel jezgra	ACR nulta krvne žile citoplazma	0,373	0,017
ACR indik hepatociti citoplazma	ACR indik hepatociti jezgra	0,349	0,031
ACR indik hepatociti citoplazma	ACR indik žučni epitel citoplazma	0,395	0,014
ACR indik hepatociti citoplazma	ACR indik stroma	0,426	0,007
ACR indik hepatociti citoplazma	HNE indik hepatociti citoplazma	0,410	0,010
ACR indik hepatociti citoplazma	HNE indik žučni epitel citoplazma	0,425	0,007

ACR indik hepatociti citoplazma	NRF2 indik hepatociti citoplazma	0,478	0,002
ACR indik hepatociti citoplazma	NRF2 indik žučni epitel citoplazma	0,378	0,019
ACR indik hepatociti jezgra	ACR indik stroma	0,371	0,021
ACR indik žučni epitel citoplazma	ACR indik stroma	0,424	0,008
ACR indik krvne žile citoplazma	ACR indik stroma	0,484	0,002
ACR indik krvne žile citoplazma	HNE indik hepatociti jezgra	0,352	0,030
ACR indik krvne žile citoplazma	NRF2 indik hepatociti jezgra	0,370	0,022
HNE nulta hepatociti citoplazma	NRF2 nulta hepatociti citoplazma	0,353	0,025
HNE nulta hepatociti citoplazma	NRF2 nulta žučni epitel citoplazma	0,333	0,035
HNE nulta žučni epitel citoplazma	NRF2 nulta žučni epitel citoplazma	0,558	0,0001
HNE nulta žučni epitel jezgra	HNE nulta krvne žile jezgra	0,367	0,019
HNE nulta žučni epitel jezgra	NRF2 nulta žučni epitel jezgra	0,334	0,035
HNE indik hepatociti citoplazma	HNE indik hepatociti jezgra	0,333	0,038
HNE indik hepatociti citoplazma	HNE indik žučni epitel citoplazma	0,670	0,000003
HNE indik hepatociti citoplazma	NRF2 indik hepatociti citoplazma	0,543	0,0004
HNE indik hepatociti citoplazma	NRF2 indik hepatociti jezgra	0,330	0,043
HNE indik hepatociti citoplazma	NRF2 indik žučni epitel citoplazma	0,365	0,024
HNE indik hepatociti jezgra	HNE indik žučni epitel citoplazma	0,410	0,009
HNE indik žučni epitel citoplazma	NRF2 indik hepatociti citoplazma	0,471	0,002
HNE indik žučni epitel citoplazma	NRF2 indik žučni epitel citoplazma	0,484	0,002

HNE indik žučni epitel jezgra	NRF2 indik žučni epitel jezgra	0,345	0,033
NRF2 nulta hepatociti citoplazma	NRF2 nulta žučni epitel citoplazma	0,615	0,00002
NRF2 nulta hepatociti jezgra	NRF2 nulta žučni epitel citoplazma	0,345	0,029
NRF2 nulta hepatociti jezgra	NRF2 nulta žučni epitel jezgra	0,322	0,042
NRF2 indik hepatociti citoplazma	NRF2 indik žučni epitel citoplazma	0,698	0,000001

Tablica 16. Negativna korelacija imunohistokemijskih parametara (Spearmanova korelacija)

Korelirani parametri			
Parametar 1	Parametar 2	Koeficijent korelacije	p
ACR nulta hepatociti citoplazma	ACR indik žučni epitel citoplazma	-0,395	0,014
ACR nulta hepatociti citoplazma	ACR indik krvne žile citoplazma	-0,393	0,014
NRF2 indik hepatociti citoplazma	NRF2 indik žučni epitel jezgra	-0,404	0,011

Analizom korelacija dodatno smo potvrdili prethodno dobivene rezultate, naročito glede ASO i faktora koji utječu na njega (dob i BMI donora i primatelja, RAI i broj leukocita prije indikacijske biopsije). Također, imunohistokemijski biljezi prate rezultate dobivene usporedbom nulte i indikacijske biopsije u promatranim skupinama. Naj snažniju pozitivnu korelaciju imali su ACR nulta žučni epitel citoplazma vs. ACR nulta žučni epitel jezgra ( $\rho=0,680$ ,  $p=0,000001$ ), ACR nulta hepatociti citoplazma vs. ACR nulta hepatociti jezgra ( $\rho=0,507$ ,  $p=0,00048$ ), HNE indik hepatociti citoplazma vs. HNE indik žučni epitel citoplazma ( $\rho=0,669$ ,  $p=0,0000031$ ), NRF2 nulta hepatociti citoplazma vs. NRF2 nulta žučni epitel citoplazma ( $\rho=0,615$ ,  $p=0,000023$ ) i NRF2 indik hepatociti jetra vs. NRF2 indik žučni epitel citoplazma ( $\rho=0,698$ ,  $p=0,000001$ ).

Upotreba korelacije nam može omogućiti predviđanje ponašanja ili izraženosti pojedinog parametra u patohistološkim preparatima za buduće analize.

## 6. RASPRAVA

Transplantacija jetre još uvijek je najuspješnija metoda liječenja bolesnika s ireverzibilnim akutnim ili kroničnim zatajenjem jetre. Zahvaljujući razvitku kirurških tehnika i unapređenju imunosupresivnih protokola, ostvareno je značajno poboljšanje preživljenja, kako presatka tako i primatelja nakon transplantacije jetre. Uvođenje kalcineurinskih inhibitora, ciklosporina i takrolimusa značajno je smanjilo stopu akutnog staničnog odbacivanja i uvelike poboljšalo jednogodišnje preživljenje primatelja jetre<sup>205,206</sup>.

Odbacivanje presatka imunološka je reakcija na prisutnost stranog organa koja može dovesti do disfunkcije i zatajenja presatka<sup>207</sup>. Za dijagnozu i klasifikaciju odbacivanja presatka nužna je njegova biopsija, a ovisno o histopatološkoj slici odbacivanje presatka jetre dijeli se na tri osnovna tipa: akutno stanično odbacivanje (ASO), kronično odbacivanje i odbacivanje posredovano protutijelima<sup>207</sup>.

Danas se u Kliničkoj bolnici Merkur, iz koje su regrutirani svi bolesnici predmetnog istraživanja, obavlja preko 90% transplantacija jetre u Republici Hrvatskoj, odnosno između 110 i 120 transplantacija jetre godišnje. Gotovo sve transplantacije obavljaju se s umrlog davatelja, a alkoholna bolest jetre najčešća je indikacija za transplantaciju jetre u Kliničkoj bolnici Merkur.

U istraživanje je uključeno ukupno 40 bolesnika s transplantacijom jetre u razdoblju od 2005. do 2015. godine. Bolesnici su morali zadovoljiti izrazito specifične i uske kriterije, što je predstavljalo određeni izazov, te se istraživanje odvijalo kroz relativno dugi vremenski period od 10 godina.

Obje biopsije, i nulta i indikacijska, morale su biti uzete unutar istog perioda hospitalizacije, kako bi se osigurao kontrolirani i kontinuirani nadzor nad liječenjem i dijetetskim režimom bolesnika. Time su izbjegnuti vanjski utjecaji unosa potencijalnih toksina, neadekvatnih doza ili slučajnog izostavljanja doze imunosupresiva, što bi sve u konačnici moglo dovesti do disfunkcije presatka jetre.

Bolesnici su morali biti stariji od 18 godina, bez prisutnog hepatocelularnog karcinoma (HCC) i nisu smjeli prethodno imati transplantaciju nekog solidnog organa. Bolesnici s cirozom imaju izrazito visok rizik od nastanka HCC-a. Povećana razina oksidacijskog stresa i blokada antioksidacijskih mehanizama, pojačavaju karcinogenezu, odnosno prelazak iz steatoze u karcinom<sup>208</sup>. Kod bolesnika s hepatitisom C, sam virus dodatno povećava razinu oksidacijskog stresa te je proces karcinogeneze ubrzan. To je razlog zašto je bilo vrlo teško naći bolesnike s HCV infekcijom, u vrijeme kada se stekne indikacija za transplantaciju jetre, bez prisutnog makroskopski vidljivog HCC-a. Iz tog razloga broj bolesnika u skupini HCV je relativno malen.

Isto tako, ne postoji definirani konsensus ni protokol uzimanja biopsija, što znači da se niti nulta niti indikacijska biopsija ne uzimaju rutinski. Nulta biopsija prije implantacije presatka jetre uzima se kako bi se evaluirale eventualne lezije u doniranom organu, posebice steatoza i fibroza, ili lezije uzrokovane prezervacijom samog organa<sup>208</sup>. Najčešće se izvode kada eksplantacijski kirurg ima makroskopski suspektan organ s masnom infiltracijom (ako je u više od 60% jetrenog

parenhima prisutna makrovezikularna statoza, tada takav organ nije pogodan za transplantaciju), koja kasnije može dovesti do odgođene sintetske funkcije presatka ili kod hemodinamski nestabilnih donora kod kojih cirkulatorna nestabilnost može dovesti do ishemijske potencijalnog presatka te uzrokovati izrazito snažnu ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu prilikom samog čina transplantacije, što ima za posljedicu kolestazu, nekrozu hepatocita i lobularnu infiltraciju neutrofilima.

Protokolarnе indikacijske biopsije se također ne rade rutinski. U prošlosti su neki transplantacijski centri provodili protokolarnе biopsije rano nakon transplantacije jetre te je čak do 80% bolesnika imalo histološke karakteristike ASO-a. Međutim, najveći dio tako dijagnosticiranih epizoda ASO-a bile su blage i nisu utjecale na preživljenje presatka<sup>209,210</sup>. S obzirom na činjenicu da limfocitna infiltracija može označavati početak razvoja imunitolerancije, ne preporuča se liječiti odbacivanje ako je postavljeno samo na temelju biopsije. Stoga su protokolarnе biopsije napuštene te se danas samo bolesnici s kliničkom sumnjom na ASO podvrgavaju biopsiji presatka.

Unatoč unapređenju imunosupresivnih protokola i činjenici da se radi o imunoprivilegiranom organu, ASO je još uvijek česta komplikacija nakon transplantacije jetre koja se javlja u 10% do 30% primatelja<sup>211</sup>. U najvećem boju slučajeva ASO se pojavljuje unutar par mjeseci od transplantacije jetre. Epizode ranog ASO ne utječu značajno na dugoročno preživljenje presatka jetre. Nasuprot tome, kasni nastup ASO (3-6 mjeseci nakon transplantacije) povezan je s lošijim preživljenjem presatka<sup>212</sup>.

Ukupna incidencija ASO u predmetnom istraživanju iznosila je 65%, a prema etiološkim skupinama ono je iznosilo 59.1% u bolesnika s alkoholnom bolesti jetre i 72.2% u bolesnika s hepatitisom C. Skupine se međusobno nisu razlikovale po dobi, spolu, BMI-u i MELD-u.

Prosječna dob bolesnika koji su podvrgnuti transplantaciji jetre iznosila je 54 godine, što je usporedivo s podacima iz svjetske literature<sup>213</sup>. Također, dostupni podaci sugeriraju da indikacija za transplantaciju jetre može biti povezana s većim rizikom za ASO, pri čemu se pokazalo da su primarni sklerozirajući kolangitis i autoimuni hepatitis povezani s višim rizikom. Kod bolesnika s kolestatskim autoimunim bolestima incidencija ASO iznosi 49%, kao i kod bolesnika s hepatitisom C (49%), što je znatno više nego kod alkoholne bolesti jetre (27%) ili kod bolesnika s kroničnom infekcijom virusom hepatitisa B (19%)<sup>214</sup>. Dodatno, veća je vjerojatnost da će bolesnici koji su podvrgnuti retransplantaciji imati ASO<sup>215</sup>.

Medicinska literatura u Republici Hrvatskoj koja se bavi istraživanjem ASO nakon transplantacije jetre jako je siromašna. Do sada je iznjedrila dva relevantna rada, izrađena u KB Merkur na bolesnicima s alkoholnom bolesti jetre. Prvo istraživanje referira incidenciju ranog ASO od 19.3%, gdje su bolesnici s ASO imali značajno više vrijednosti jetrenih enzima: AST 186 vs. 163 U/L ( $p < 0.001$ ), ALT 404 vs. 366 U/L ( $p = 0.01$ ), GGT 584 vs. 258 U/L ( $p < 0.001$ ), AP 195 vs. 86 U/L ( $p < 0.001$ ) i bilirubina 69 vs. 51  $\mu\text{mol/L}$  ( $p = 0.01$ ) odnosu na skupinu bez ASO, međutim njihova sintetska funkcija presatka nije bila narušena<sup>216</sup>. Drugo istraživanje, ono

Ostojić i suradnika provedeno je u KB Merkur od 2009. do 2017. godine na 215 bolesnika transplantiranih radi alkoholne ciroze jetre, od kojih je njih 24% imalo i hepatocelularni karcinom (HCC). U tom uzorku incidencija ranog ASO kod alkoholne bolesti jetre iznosila je 27.4%<sup>217</sup>. Incidencije ranog ASO u oba istraživanja u skladu su sa svjetskom literaturom.

Iako je naše istraživanje rađeno na sličnoj populaciji, u istoj kliničkoj bolnici u sličnom vremenskom periodu (djelomično se i preklapaju), incidencija ranog ASO u skupini EtOH bila je značajno viša. Postoji više razloga koji mogu objasniti dobivene rezultate. Prvo, naše indikacijske biopsije rađene su u istoj hospitalizaciji kada je učinjena i transplantacija jetre, dok je u istraživanju Ostojić i suradnika većina bolesnika otpuštena kući te su indikacijske biopsije učinjene prilikom rutinske kontrole nakon dobivenih patoloških laboratorijskih nalaza. Pretpostavka je da su naši bolesnici bili kontinuirano praćeni te iz tog razloga bolje klinički procijenjeni. Odnosno na osnovu više parametara (kliničke slike i laboratorijskih vrijednosti) pomno je razmotrena odluka o izvođenju indikacijske biopsije samo u onih bolesnika za koje smo predmnijevali da imaju ASO.

Drugo, u istraživanju Ostojić i suradnika bili su uključeni i bolesnici s HCC-om. Poznato je kako bolesnici s HCC-om često razviju ranu disfunkciju presatka, najčešće radi loše preoperativne kondicije primatelja, a rjeđe radi intraoperativne ozljede presatka. Isto tako, bolesnici s HCC-om imaju lošije ukupno preživljenje nakon transplantacije jetre u odnosu na bolesnike bez HCC-a<sup>218</sup>. Pretpostavka je da bolesnici s HCC-om razviju ranu disfunkcija presatka koja se očituje abnormalnim vrijednostima jetrenih enzima i/ili smanjenoj sintetskoj funkciji, što odgovara i slici ranog ASO. Posljedično tome se i indikacijska biopsija češće izvodi, ali bez potvrde ASO.

Za incidenciju ASO među bolesnicima s hepatitisom C nema podataka u Republici Hrvatskoj. Naše istraživanje je pionirsko i prvo takvog tipa kojim potvrđujemo incidenciju ASO u bolesnika s HCV-om. Incidencija je očekivano viša nego u skupini EtOH, i puno viša u usporedbi sa svjetskom literaturom, najvjerojatnije iz istih razloga kao i za skupinu EtOH. Naše istraživanje može poslužiti kao temelj za nova, buduća istraživanja na puno većem uzorku.

Uspoređujući skupine sa i bez akutnog staničnog odbacivanja, značajna razlika detektirana je vezano za dob i BMI primatelja i donora, kao i za dan suspektnog ranog odbacivanja. Upravo je mlađa životna dob primatelja i donora važan faktor u odbacivanju presatka jetre. Naše istraživanje poklapa se s podacima iz relevantne svjetske literature.

U jednoj od najvažnijih ranih studija iz područja transplantacije jetre iz 1998. godine koja je ispitivala rizične čimbenike za ASO Weiser i suradnici na 762 ispitanika identificirali su mlađu životnu dob primatelja, uredne vrijednosti kreatinina i povišene vrijednosti AST-a primatelja prije transplantacije jetre, HLA-DR nepodudarnost, vrijeme hladne ishemije dulje od 15 h i dob donora (stariji od 30 godina) kao nezavisne prediktore za razvoj ASO-a<sup>105</sup>. U istraživanju iz 2016. godine koje je ispitivalo rizične čimbenike ASO-a provedenom na 42.508 ispitanika Kuhet i suradnici ustanovili su da je mlađa životna dob dominantni čimbenik rizika za ASO, pri čemu bolesnici koji su stari između 18 i 25 godina imaju tri puta veći rizik za ASO u odnosu na



bolesnike starije od 40 godina. U istom istraživanju utvrdili su da su životna dob primatelja viša od 70 godina (omjer izgleda, engl. *odds ratio*, OR 0,68) te dob primatelja od 65 do 69 godina (OR 0,70) najznačajniji protektivni čimbenici<sup>215</sup>. Nadalje, poznato je da Afroamerikanci imaju značajno viši rizik za ASO<sup>219</sup>.

Isto tako, studija koju su proveli Onaca i suradnici pokazuje kako bolesnici stariji od 60 godina pokazuju veću incidenciju ASO ako su njihovi donori imali manje od 50 godina<sup>220</sup>. Najbolje objašnjenje toj pojavi je činjenica kako imunološki odgovor postupno slabi s godinama i da su presadci mlađih donora više imunogeni. Iz tog razloga, kod bolesnika starijih od 60 godina moglo bi se razmišljati o smanjivanju doze imunosupresivnih lijekova, kako bi se smanjila incidencija nuspojava i komplikacija vezanih uz liječenje.

U postupcima transplantacijske medicine, previsok ili prenizak indeks tjelesne mase je od izrazito velikog značenja jer značajno povisuje rizik od nastanka komplikacija i neželjenih efekata.

Većina kandidata na listi za transplantaciju jetre ima povišen BMI. Pretile osobe često imaju komorbiditete poput šećerne i koronarne bolesti, metaboličkog sindroma i opstruktivne apneje u snu, što negativno utječe na ishode liječenja nakon transplantacije. Ti bolesnici se teže oporavljaju nakon kirurškog zahvata, skloniji su tromboembolijskim incidentima, i samim time je boravak u bolnici produžen.

Prema podacima Nunez i suradnika povišeni BMI povezan je s povećanim rizikom od ASO nakon transplantacije bubrega i srca<sup>221</sup>. Jetra je nešto specifičniji organ. Za razliku od bubrega i srca ona je imunoprivilegirana te određeni broj bolesnika dugoročno nakon transplantacije može razviti i toleranciju na presadak, odnosno stanje koje ne zahtijeva uzimanje imunosupresivnih lijekova.

Godine 2015. Bambha i suradnici proveli su opsežnu studiju na 45.551 bolesnika s transplantacijom jetre o utjecaju BMI na ishod transplantacije. Zaključili su kako povišene vrijednosti BMI nisu povezane s povećanim rizikom od smrti ili gubitka organa<sup>222</sup>. Međutim, nedostaju podaci o utjecaju BMI na ASO. Prema studiji Qiang i suradnika, ženski spol (engl. *hazard ratio*, 2.801;  $P = 0.024$ ) i visoki BMI primatelja (*hazard ratio*, 1.005;  $P = 0.049$ ) su dva nezavisna prediktora ranog ASO<sup>223</sup>. Flabouris i suradnici iznose teoriju kako su bolesnici s visokim BMI subdozirani, te stoga lakše doživljavaju epizode ASO. Jednom kad se farmakodinamika i farmakokinetika imunosupresivnih lijekova podese prema BMI-u primatelja, onda je i rizik i incidencija ASO znatno niža<sup>224</sup>.

U našem istraživanju primatelji s nižim BMI, imali su značajno veću incidenciju ranog ASO ( $26.00 \pm 0.69$  vs.  $29.11 \pm 1.20$ ,  $p = 0.0204$ ). Nažalost, naše podatke nismo mogli usporediti sa sličnim referencama u dostupnoj literaturi.

Dvije značajne studije provedene na ukupno 93.832 bolesnika navode kako izrazito pothranjeni i morbidno pretili bolesnici imaju povišenu stopu mortaliteta unutar 90 dana od transplantacije<sup>222,225</sup>. Ukupno petogodišnje preživljenje iznosi 73.9% za primatelje s normalnom tjelesnom težinom, za pothranjene ono pada na 71.1%, kao i za izrazito pretile na 71.5%<sup>225</sup>.

Pothranjeni bolesnici imaju povećan rizik smrtnog ishoda i gubitka presatka nakon transplantacije jetre, naročito ako imaju i nizak MELD, dok to nije slučaj kod pretilih bolesnika. Ono s čime bi mogli povezati niži BMI s incidencijom ASO u našem istraživanju je kondicija bolesnika s kojom pristupaju transplantaciji jetre. Poznato je da ciroza jetre u uznapredovaloj fazi iscrpljuje organizam. Česte su endotoksemije radi spontanog bakterijskog peritonitisa što za posljedicu ima pokretanje adrenergičkog sustava, hipermetabolizam i sarkopeniju (gubitak mišićne mase iz skeletnih mišića)<sup>226</sup>.

U engleskom govornom području postoji odličan izraz *frailty*, koji najbolje opisuje stanje takvih bolesnika, a koji se na hrvatski prevodi kao slabost ili krhkost. On ne označava samo nizak BMI odnosno pothranjene bolesnike, nego se odnosi na opće stanje ili kondiciju bolesnika. Obuhvaća gubitak tjelesne težine uslijed sarkopenije, umor, lošu toleranciju napora, fizičku i kognitivnu usporenost. Tako da i bolesnici s urednim BMI mogu razviti ovaj sindrom, čime bi mogli objasniti rezultate u našem istraživanju. Pretpostavka je da bolesnici s nižom, ali još uvijek urednom vrijednosti BMI ako imaju sindrom krhkosti, onda je i veći rizik od razvoja ASO, unatoč urednoj razini imunosupresije. Ova pretpostavka otvara prostor za buduća prospektivna klinička istraživanja, jer sindrom krhkosti se mora objektivizirati, klinički prepoznati i izmjeriti. Kod bolesnika sa sindromom krhkosti trebalo bi se pokušati optimizirati nutritivni status prije transplantacije ili smanjiti vrijeme čekanja na transplantaciju, te nakon transplantacije obratiti dodatnu pozornost na moguće epizode ASO.

U posljednja dva desetljeća događa se porast pretilih bolesnika, a posljedično tome i pretilih donora. BMI donora jedan je od kriterija koji se uzima prilikom odluke je li donor prihvatljiv. I pretili donori s BMI > 35 kg/m<sup>2</sup> nisu kontraindicirani kao donori organa, jer nije nađena povezanost takvog BMI s preživljenjem kod adultnih transplantacija. Prilikom odabira takvog donora, moramo imati na umu da će takvi donori najčešće imati steatozu jetre, koja je neovisni prediktor gubitka presatka<sup>227</sup>.

Nema literaturnih podataka o donorima s niskim BMI te njihovoj povezanosti s preživljenjem bolesnik i presatka, kao ni povezanosti s ASO. Ovo istraživanje referira povezanost nižeg BMI s incidencijom ranog ASO i prvo je tog tipa u medicinskoj literaturi. Najvjerojatniji uzrok tome je uska povezanost BMI i spola donora. Najveći broj donora s nižim BMI u skupini s ASO je bilo mlađe od 50 godina. Radi li se o slučajnosti ili pravilu, trebalo bi potvrditi u budućim istraživanjima na većem uzorku.

U zadnjih nekoliko godina objavljen je veliki broj znanstvenih istraživanja na temu nekompatibilnosti spolova između donora i primatelja te njezinog utjecaja na ishod transplantacije. Navode kako je spolna nekompatibilnost između donora i primatelja neovisan faktor rizika za ASO. Naročito se to pokazalo za ženske donirane organe koji idu muškim primateljima prilikom transplantacije jetre<sup>228,229</sup> i srca<sup>230</sup>. Konkretno, u nedavnoj retrospektivnoj studiji, Schoening i suradnici procjenjujući učinak spolnih razlika na dugoročno preživljenje presatka nakon transplantacije jetre, utvrdili su da je kombinacija žena donor-muškarac primatelj pokazala najgore preživljenje presatka<sup>231</sup>. Sugerirali su da bi ovaj događaj mogao biti uzrokovan

smanjenom "kvalitetom" donorica (davateljice su bile znatno starije, umirale su znatno češće od cerebrovaskularnih uzroka, a rjeđe od traume) i nepovoljne karakteristike muških primatelja (veća učestalost hepatocelularnog karcinoma u muškoj skupini primatelja). Zanimljivo je da je u studijama provedenim na životinjskim modelima dokazano da jetra ženki štakora pokazuje povećanu razinu acidoze tijekom ishemije u usporedbi s jetrom mužjaka štakora. Čini se kako je ova spolna razlika u metaboličkom odgovoru jetre na ishemiju posredovana estrogenom i mogla bi imati značajan utjecaj na ishod transplantacije<sup>232,233</sup>. Budući da je sličan spolno ovisni metabolički odgovor utvrđen i u funkciji miokarda<sup>234</sup>, ne može se isključiti mogućnost da bi ova spolna razlika mogla utjecati na transplantaciju srca. Syn i suradnici također dovode u korelaciju ženski spol donora kao čimbenik rizika za nastanak progresivne fibroze nakon transplantacije jetre i sugeriraju da je taj nalaz povezan s manjim nekompatibilnostima antigena histokompatibilnosti<sup>235</sup>. Nasuprot tome, Candinas i suradnici smatraju kako je vjerojatnije da će primateljice razviti kronično odbacivanje presatka jetre ako je donor bio muškarac, a ne žena (9,4% prema 1,4%)<sup>236</sup>. Poznato je da su imunološki odgovori kod žena snažniji od onih u muškaraca i da je učestalost imunološki posredovanih bolesti veća kod žena<sup>237</sup>. Transplantacija jetre dovodi do aktiviranja kaskade komplementa prilikom nastanka reperfuzijsko-ishemijske ozljede u transplantiranoj jetri<sup>238</sup>. Isto tako je zabilježena povećana koncentracija mikrosomalnih oksidativnih enzima kod muškaraca te različiti broj estrogenskih i androgenih receptora u hepatocitima kod muškaraca i žena<sup>239</sup>. Sve to može doprinijeti utjecaju spola na klinički ishod nakon transplantacije jetre. U ovom istraživanju nije dokazano da nepodudarnost između spola donora i primatelja utječe na incidenciju ASO, a samim time ni na preživljenje presatka jetre.

Funkcija presatka jetre neinvazivno se nadzire standardnim laboratorijskim pretragama poput ukupnog bilirubina, transaminaza jetre i kolestatskih enzima u serumu. Dodatno se analizira broj leukocita i eozinofila, kao i razina imunosupresivnih lijekova u krvi. Na taj način pokušavaju se detektirati subkliničke ozljede parenhima jetre i predvidjeti pojavu mogućeg odbacivanja presatka. Smisao potrage za neinvazivnim bilježima ASO-a je individualizacija imunosupresivnog liječenja u svrhu smanjivanja nuspojava i izbjegavanja komplikacija uslijed dugoročnog uzimanja imunosupresivnog liječenja<sup>240</sup>.

U sličnom nastojanju analizirani su dostupni laboratorijski parametri bolesnika uzetih u vrijeme uzimanja nulte i indikacijske biopsije između skupina sa i bez ASO. Cilj je bio ustanoviti postoji li neki biokemijski biljeg koji bi mogao ukazati na postojanje ASO. Rezultati su pokazali značajniju razliku samo u broju leukocita u trenutku kada se posumnjalo na ASO i kada se odlučilo za izvođenje indikacijske biopsije za potvrdu, odnosno odbacivanje sumnje na ASO. Bolesnici s dokazanim ASO imali su viši broj leukocita, makar još uvijek u referentnom intervalu vrijednosti, u odnosu na skupinu bez ASO.

Leukociti čine važnu komponentu obrane organizma od infekcija, a proizvode ih hematopoetske matične stanice u koštanoj srži. Leukocitoza odnosno povećan broj leukocita ( $>10 \times 10^9/l$ ) često se vidi u bolesnika s akutnim ili kroničnim infekcijama, ali i nakon stresa, konvulzija,

operativnog zahvata ili upotrebe kateholamina (npr. adrenalina) i steroida u liječenju. Nasuprot tome, imunosupresivno liječenje bazirano na kalcineurinskim inhibitorima i/ili mikofenolat mofetilu često rezultira s padom broja leukocita. Helfritz i suradnici su pokazali porast broja leukocita  $>20 \times 10^9/l$  rano nakon transplantacije jetre koji je bio je praćen gubitkom presatka i povećanom smrtnosti unutar godine dana (30% naspram 13%)<sup>241</sup>. Taj podatak može ukazivati na razvoj infekcije u vrlo ranoj fazi nakon transplantacije jetre, makar nije bilo značajnijih razlika u drugim infektivnim biljezima poput C-reaktivnog proteina ili prokalcitonina. Isto tako, nije pronađena korelacija između broja leukocita i broja epizoda ASO. Rezultati ovog rada pokazuju značajnije povišen broj leukocita u trenutku postavljanja indikacije za biopsiju jetre radi suspektog ASO, ali je taj broj još uvijek bio u referentnim vrijednostima. U bolesnika s dokazanim ASO nije pronađena razlika između bolesnika u skupini EtOH i skupini HCV. Iz tog se razloga povišeni broj leukocita ne može povezati s reinfekcijom presatka virusom hepatitisa C, već s epizodom ASO. Dodatna potvrda za to dobivena je i time što nije pronađena razlika u razini CRP-a prilikom indikacijske biopsije, koji je jedan od infektivnih biljega. U nastojanju da se odredi uniformna definicija kliničke sumnje na ASO, Rodríguez- Perálvarez i suradnici istraživali su rizične čimbenike za ASO na 142 bolesnika u ispitivanoj skupini i na 328 ispitanika u validacijskoj skupini te su ustanovili da su vrijednosti bilirubina iznad  $68,4 \mu\text{mol/L}$ , povišene vrijednosti eozinofila u krvi  $>0,4 \times 10^9$  u prvih 10 dana od transplantacije jetre i  $>0,1 \times 10^9$  nakon 10 dana od transplantacije jetre rizični čimbenici za srednji do teški ASO i mogu se koristiti kao objektivni kriteriji za trijažu bolesnika koji imaju indikaciju za biopsiju jetre<sup>242</sup>. Ovo istraživanje nije pokazalo eozinofiliju ni hiperbilirubinemiju kao pogodne biljege za predikciju ASO. Mogući razlog tome je izostanak teškog oblika ASO-a u naših bolesnika, koji dobro korelira s ova dva parametra.

Nakon transplantacije jetre bolesnici moraju doživotno uzimati imunosupresivne lijekove kako bi se spriječilo odbacivanje presatka. Kako je prethodno navedeno, uvođenje kalcineurinskih inhibitora (ciklosporina i takrolimusa) dovelo je do značajnog smanjenja stope ASO-a i značajno se poboljšalo jednogodišnje preživljenje bolesnika. Većina epizoda ASO-a javlja se u prvih pet do 30 dana nakon transplantacije jetre, no epizoda ASO-a može se javiti već drugog dana nakon operacije pa do godinu dana od transplantacije jetre<sup>206,211</sup>. Obzirom da je ASO klinički značajan događaj koji ugrožava preživljenje i presatka i primatelja, zbrinjavanje bolesnika nakon transplantacije solidnih organa usredotočeno je na njegovo sprečavanje. Iako ciklosporin i takrolimus imaju sličan mehanizam aktivnosti, postoje studije koje govore o različitim incidencijama ASO obzirom na izbor inicijalnih imunosupresivnih lijekova. U meta-analizi 16 randomiziranih kliničkih studija takrolimus se pokazao superiornijim od ciklosporina nakon analiza preživljenja primatelja i presatka te akutnog staničnog odbacivanja i steroid- rezistentnog odbacivanja<sup>243</sup>. Međutim, u meta-analizi koja je obuhvatila 9 randomiziranih studija bolesnika s HCV-om, nije zabilježena razlika u preživljenju bolesnika i presatka vezana uz izbor inicijalnog kalcineurinskog inhibitora<sup>244</sup>. Ovo istraživanje nije pokazalo razliku između skupina s i bez ASO, neovisno o etiologiji, vezano uz vrstu inicijalnih imunosupresivnih lijekova korištenih

nakon transplantacije jetre. Indukcijsko imunosupresivno liječenje nakon transplantacije sastojalo se od visokih doza kortikosteroida te postupnog snižavanja njihove doze prema protokolu do potpunog prekida tri mjeseca nakon transplantacije jetre. Liječenje održavanja imunosupresije sastojalo se od takrolimusa ili ciklosporina te mikofenolat mofetila, čije doze su se postupno titrirale uz svakodnevno mjerenje serumskih koncentracija takrolimusa i ciklosporina. Ciljane serumske koncentracije bile su u preporučenim referentnim intervalima u obje promatrane skupine, za ciklosporin one iznose od 150 do 200 ng/mL, a za takrolimus od 8 do 10 ng/mL u prva tri mjeseca od transplantacije<sup>245</sup>. Najvjerojatnije je ovakav način titriranja doza i kontinuirani nadzor serumskih koncentracija imunosupresivnih lijekova razlog izostanka epizoda teškog ASO-a. Očigledno je da razloge pojave ASO-a moramo tražiti drugdje, a ne u vrsti i koncentraciji inicijalnih imunosupresivnih lijekova.

Oksidacijski stres, neravnoteža između stvaranja reaktivnih slobodnih radikala i antioksidacijske obrane, jedan je od glavnih događaja koji utječu na ishod presatka tijekom peritransplantacijskog perioda. Oksidacijski stres povezan je s nekolicinom patoloških stanja poput sarkopenije i sindroma krhkosti te nastanka kardiovaskularnih bolesti, kronične opstruktivne bolesti pluća, kronične renalne insuficijencije, neurodegenerativnih bolesti i nastanka karcinoma<sup>246</sup>. Kandidati za transplantaciju organa ulaze u sam akt transplantacije s povišenom razinom oksidacijskog stresa, koji je povezan s upalom i terminalnom fazom zatajivanja organa. Razina oksidacijskog stresa dodatno se povećava uslijed ishemije i reperfuzije organa prilikom transplantacije, a nakon transplantacije i radi uvođenja imunosupresivenog liječenja<sup>247</sup>. Poveznost oksidacijskog stresa i transplantacije organa najbolje je proučena na bolesnicima s transplantacijom bubrega. ROS stvoren prije transplantacije, nakon samog postupka nije odmah u potpunosti eliminiran. Prema podacima dobivenih od primatelja bubrega sa živog donora, smanjenje razine oksidacijskog stresa započinje neposredno nakon transplantacije i kontinuirano se nastavlja unutar prvih mjesec dana nakon transplantacije<sup>248</sup>. Potpuna remisija moguća je samo ako dođe do normalizacije funkcije transplantiranog bubrega. Sličan scenarij događa se i nakon transplantacije jetre. Većina znanja o oksidacijskom stresu u transplantaciji jetre prikupljena je na animalnim modelima, dok je broj studija na ljudima limitiran. Samo su četiri studije učinjene u kliničkim uvjetima, od čega je samo jedna mjerila serumsku razinu malondialdehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije<sup>249</sup>, dok su ostale studije koristile reducirani glutation (GSH) kao biljeg ili su mjerili ukupnu razinu ROS-a u cirkulaciji, ali nijedna u tkivu jetre. Mnogo je faktora koji ograničavaju normalizaciju razine oksidacijskog stresa i samim time povećavaju incidenciju disfunkcije organa i doprinose mogućem nastanku odbacivanja organa. Moždana smrt donora uzrokuje hemodinamsku nestabilnost u sistemske cirkulaciji i potiče proizvodnju slobodnih radikala koji uzrokuju ozbiljno oštećenje donorskog tkiva. Reperfuzija uzrokuje pojavu oksidacijskog stresa već za vrijeme prezervacije doniranog organa i povezana je s neposrednom, ali i dugoročnom funkcijom organa, te presađak postaje osjetljiv na akutno odbacivanje<sup>247</sup>. U jetri, sinusoidalne endotelne stanice su naročito podložne ozljedi. Prilikom reperfuzije dolazi do regrutacije

Kupfferovih stanica, a zatim slijedi oslobađanje citokina, aktivacija komplementa i stvaranje ROS-a, što u konačnici dovodi do razaranja membrane i smrti stanice. Nadalje, ROS igra višestruku ulogu u upalnom odgovoru nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede, na način da inducira proupalne gene, pojačanu ekspresiju antioksidacijskih enzima, regulira protok kroz jetru i regeneraciju hepatocita. U jednoj studiji na štakorima, uočeno je dramatično smanjenje antioksidacijskog kapaciteta u tkivu za vrijeme tople ishemije<sup>250</sup>. Treba napomenuti da je vrijeme tople ishemije kritičnije za indukciju oksidacijskog stresa u kadaveričnih u odnosu na žive donore. Studija Thorata i suradnika navodi smanjenu antioksidacijsku razinu i povećanu razinu lipidne peroksidacije kod bolesnika čije stanje zahtijeva transplantaciju jetre, u odnosu na zdravu populaciju. Za vrijeme reperfuzije dodatno je zabilježen pad antioksidacijskih mehanizama i porast produkata lipidne peroksidacije, u ovom slučaju MDA<sup>188</sup>. U ovom istraživanju vrijeme tople ishemije nije povećalo incidenciju akutnog odbacivanja presatka jetre. Mogući razlog tome je relativno kraće vrijeme tople ishemije u odnosu na druge centre, gdje je zabilježeno trajanje ishemije duže od 40, a ponegdje i duže od 50 minuta<sup>251</sup>. Nasuprot tome, kod bolesnika transplantiranih u KB Merkur, vrijeme tople ishemije iznosilo je nešto ispod 35 minuta. Iz toga se može zaključiti da se izvrsnom kirurškom tehnikom smanjuje vrijeme tople ishemije, a samim time se i skraćuje vrijeme prilikom kojeg nastaje oštećenje tkiva presatka. Time se u konačnici, smanjuje i mogućnost nastanka akutnog odbacivanja presatka. Zanimljiva je studija Augusto i suradnika koji su evaluirali oksidacijski stres u kasnoj fazi nakon transplantacije jetre<sup>252</sup>. Kandidati su bili podijeljeni u tri skupine: zdravi ispitanici, bolesnici s cirozom jetre koji se nalaze na listi za transplantaciju i bolesnici kojima je već učinjena transplantacija jetre, ali je od nje prošlo najmanje 12 mjeseci. Razinu oksidacijskog stresa mjerili su preko koncentracija GSH, MDA i vitamina E u plazmi. Razina GSH i MDA u plazmi bila je značajnije niža u bolesnika nakon transplantacije jetre u odnosu na druge dvije skupine. Nije bilo značajnije razlike u koncentraciji GSH i MDA između zdravih kandidata i bolesnika s cirozom jetre. Skupina s cirozom jetre i skupina nakon transplantacije imale su gotovo identično niske razine vitamina E u serumu. Ova studija pokazuje kako je kasna faza transplantacije jetre povezana sa smanjenjem lipidne peroksidacije, koja je obilježena nižim vrijednostima MDA, dok snižena razina GSH i vitamina E u odnosu na zdravu populaciju govori o tome da se oksidacijska ravnoteža ne postigne još dugo nakon transplantacije. Pretpostavka je da će se i drugi aldehidi, produkti lipidne peroksidacije, poput akroleina i HNE-a nalaziti u transplantiranoj jetri te da će im razina biti povišena, makar je dostupna literatura izrazito siromašna po tom pitanju. HNE je već opisan kao stabilni biljeg lipidne peroksidacije u bolestima jetre, iako nedostaju podaci za transplantaciju jetre<sup>253</sup>. Isto tako, vizualizacija HNE-a imunohistokemijskim metodama u biopsijama jetre već je prethodno vrlo jasno opisana<sup>254</sup>. U nealkoholnoj masnoj infiltraciji jetre i nealkoholnom steatohepatitisu HNE je lokaliziran u citoplazmi sinusoidalnih endotelnih stanica i hepatocitima, predominantno u onima oko centralne vene jetrenog parenhima. Isto tako, stupanj upale i nekroze kao i stadij fibroze značajno koreliraju sa stupnjem izraženosti HNE-a. Za razliku od toga, nedostaju dokazi direktne povezanosti akroleina u bolestima jetre i njegove izraženosti u jetrenom parenhimu. Lipidna peroksidacija primarno je ustanovljena u krvi (plazmi i serumu) i

rijetko je mjerena direktno u tkivu jetre. Za sada je nejasno da li izmjerena razina lipidne peroksidacije u krvi stvarno dobro reflektira i stanje u samom jetrenom parenhimu. Rad Podszun i suradnika jedan je od prvih koji je kvantificirao detekciju HNE-a kao produkta lipidne peroksidacije u samom jetrenom parenhimu kod bolesnika s nealkoholnom masnom infiltracijom jetre<sup>255</sup>.

Slična su bila i naša nastojanja gdje smo u nultim i indikacijskim biopsijama jetre imunohistokemijskim metodama vizualizirali razinu akroleina i HNE-a u jetrenom parenhimu, te mjerili razinu antioksidacijske zaštite preko antioksidacijskog transkripcijskog čimbenika NRF2. Mišljenja smo da je mjerenje ovih biljega direktno u samom parenhimu pouzdanije za dokazivanje povezanosti same transplantacije jetre, a naročito ASO u presatku jetre, i oksidacijskog stresa. U budućim istraživanjima mogla bi se tražiti korelacija izraženosti ACR i HNE u parenhimu jetre i u cirkulaciji, što bi rezultiralo manje invazivnim i elegantnijim dokazivanjem oksidacijskog stresa u transplantiranih bolesnika, naročito za epizode ASO-a.

U našem radu dokazali smo prisutnost produkata lipidne peroksidacije, konkretno akroleina i HNE-a, direktno u samom parenhimu jetre i u nultoj i indikacijskoj biopsiji. Ta činjenica govori o tome da bolesnici ulaze u sam akt transplantacije s povišenom razinom oksidacijskog stresa, koji zaostaje još određeni vremenski period nakon učinjene transplantacije. Akrolein je znatno više prisutan u tkivu jetre, ako se uspoređuje postotak pozitivnih stanica i intenzitet, u odnosu na HNE. Nalazi se u svim stanicama parenhima jetre (hepatocitima, epitelu žučnih vodova, stanicama krvnih žila i stromi), dok je HNE uglavnom ograničen na citoplazmu hepatocita i epitela žučnih vodova. Uočeno je smanjenje pozitiviteta akroleina i HNE-a u indikacijskim biopsijama u odnosu na nultu, što nameće zaključak kako se razina oksidacijskog stresa smanjuje tijekom vremena i prati oporavak presatka jetre, naravno uz uvjet da izostane epizoda ASO. To je sukladno istraživanju Augusto i suradnika kod kojih je za oporavak presatka jetre trebalo proći najmanje 12 mjeseci, kako bi bolesnici dostignuli razinu oksidacijskog stresa usporedivu s onima u zdravih ispitanika<sup>252</sup>. Svi uzorci indikacijskih biopsija ovog istraživanja uzeti su unutar 3 mjeseca od transplantacije, tako da se realno nije mogao očekivati kompletni oporavak, ali pokazuje dobar i obećavajući trend.

Istraživanja upućuju kako prisutnost povećane razine akroleina i HNE-a dovode do aktivacije NRF2<sup>256-258</sup>. NRF2 se u normalnim uvjetima nalazi vezan na KEAP1, dok uslijed oksidacijskog stresa dolazi do oksidacijske modifikacije KEAP1, pri čemu on mijenja konformaciju te otpušta NRF2. Disocijacija NRF2 od KEAP1 dovodi do aktivacije NRF2, koji se onda translocira iz citoplazme u jezgru i inducira transkripciju brojnih citoprotektivnih i antioksidacijskih gena. Te činjenice su u djelomičnoj suprotnosti s našim rezultatima. Naime, unatoč visokoj razini akroleina i HNE-a, ipak ne dolazi do povećane aktivnosti NRF2, nego dapače, njegova razina je izrazito niska u parenhimu jetre. Objašnjenje nam može ponuditi istraživanje Feng i suradnika koji su proučavali učinak akroleina na humanim pigmentalnim epitelijalnim stanicama oka i učinak tokoferola kao moguće opcije u liječenju<sup>259</sup>. Osim što je akrolein izazvao oksidacijski

stres, on je uzrokovao disfunkciju mitohondrija i inaktivirao KEAP1/NRF2 transkripcijski put mehanizmom koji još nije dovoljno razjašnjen. Stanice koje su bile izložene akroleinu smanjile su ekspresiju NRF2 za 70%, dok je tokoferol za 40% povisio njegovu aktivnost i translokaciju u jezgru. To otvara nove mogućnosti tokoferola u liječenju, koje bi se mogle razmotriti u prekondicioniranju bolesnika koji čekaju transplantaciju jetre. Iz gore navedenog s jedne strane imamo HNE koji promovira aktivnost NRF2, a s druge strane imamo akrolein koji dovodi do smanjenja razine i aktivacije NRF2. Razina akroleina je puno veća od HNE-a u parenhimu jetre u stanjima oksidacijskog stresa, te je njihov nesrazmjer mogući razlog pronađene niske razine NRF2 u biopsijama jetre. Upravo taj nedostatak prisutnosti pozitiviteta NRF2 u nultim i indikacijskim biopsijama je dokaz izrazito snižene razine antioksidacijske zaštite u bolesnika koji pristupaju transplantaciji jetre, a nastavlja se i nakon učinjenog zahvata. Postupno kako dolazi do oporavka funkcije presatka nakon transplantacije, smanjuje se i razina oksidacijskog stresa (karakterizirana smanjenjem prisutnosti akroleina i HNE-a u indikacijskoj biopsiji). No, nju linearno ne prati i oporavak antioksidacijske zaštite, jer ukupna prisutnost NRF2 ostaje i dalje niska u indikacijskim biopsijama.

Još kao zanimljivost valja napomenuti kako je NRF2 pozitivitet zabilježen samo u citoplazmi u indikacijskim biopsijama u stanicama krvnih žila jetre, dok ga se u nultoj biopsiji uopće ne detektira. Mogli bi reći kako je to još jedan dokaz oporavka antioksidacijskog mehanizma, koji ima polagano uzlazni trend. Što znači, postoje naznake oporavka jer ga se počinje detektirati u citoplazmi, ali još nije dovoljno aktiviran jer bi se tada detektirao i u jezgri. Najvjerojatniji razlog zašto se nalazi baš u stanicama krvnih žila je taj jer su one u direktnom doticaju s krvi gdje se nalaze neutrofili i makrofagi u kojima postoji aktivnost NRF2. Pretpostavka je da kako napreduje oporavak antioksidacijskog mehanizma, tako se prisutnost i aktivnost NRF2 širi dublje u parenhim jetre, što bi naravno trebalo potvrditi u nekim budućim studijama.

U našem istraživanju po prvi puta je utvrđena uloga lipidne peroksidacije u patogenezi akutnog staničnog odbacivanja i utemeljena pretpostavka da je bolest povezana s oksidacijskim stresom. Po prvi puta je opisana izraženost akroleina i HNE-a, kao produkata lipidne peroksidacije, u parenhimu jetre te kako se oni ponašaju ovisno o etiologiji te prisutnosti/odsutnosti ASO između nulte i indikacijske biopsije. Kao što je prethodno opisano kad su uspoređivane nulta i indikacijska biopsija, i kod bolesnika s ASO ukupna razina akroleina je puno viša nego HNE-a. Obje razine su izraženije u nultim biopsijama i imaju trend smanjivanja u indikacijskim biopsijama, neovisno o etiologiji. U pojedinim indikacijskim biopsijama bolesnika s ASO razina HNE-a toliko se smanjila i nije više bila značajna. Iz tog razloga, prisutnost akroleina i odsutnost HNE-a u istoj promatranoj indikacijskoj biopsiji u jezgrama hepatocita i epitela žučnih vodova karakteristično je za etiologiju, konkretno za skupinu EtOH, bez obzira na prisutnost ili odsutnost ASO. Smanjenje akroleina i HNE-a u citoplazmama hepatocita u skupini HCV/ASO (ali ne i u HCV/nonASO), govori u prilog tome kako lipidna peroksidacija nije vodeći mehanizam koji se događa kod odbacivanja u skupini HCV. Također, uočeno je i smanjenje



razine HNE-a u citoplazmi stanica epitela žučnih vodova kod indikacijskih biopsija u skupini HCV/ASO, što je dodatna potvrda stava kako lipidna peroksidacija nije dovoljno snažna da bi pokrenula ASO kod bolesnika s hepatitisom C. Ta činjenica nam je izrazito interesantna, budući da su i odbacivanje i kronična infekcija s hepatitisom C stanja s povećanom razinom oksidacijskog stresa.

U citoplazmama stanica krvnih žila i u stromi jetre zabilježen je porast akroleina u indikacijskim biopsijama u skupinama bez odbacivanja, neovisno o etiologiji (skupina EtOH i HCV). Kako je već više puta navedeno, akrolein je produkt lipidne peroksidacije i poznati biljeg oksidacijskog stresa. Međutim, moguće je da on radi svog oksidacijskog statusa, inducira neke stanične obrambene mehanizme protiv oksidacijskog stresa te na taj način sprečava ASO i promovira preživljenje presatka.

Također, izostala je aktivacija NRF2 u bolesnika s dokazanim ASO, stoga se NRF2 ne može koristiti kao mogući biljeg odbacivanja te se mehanizam antioksidacijske zaštite ne može koristiti kao mogući razlikovni faktor između ASO i recidiva virusne infekcije.

NRF2 je značajan transkripcijski čimbenik za indukciju enzima za detoksikaciju i biotransformaciju. Kao što je već rečeno, oksidacijski stres pokreće njegovu aktivaciju i pomaže u detoksikaciji i uklanjanju potencijalno štetnih egzogenih toksina i metabolita. Njegova prisutnost izrazito je povećana u polimorfonuklearnim neutrofilima gdje služi kao prva linija obrane od oksidacijskog stresa. Ima i protuupalna i antioksidacijska svojstva i brzo se prilagođava upalnom miljeu. Na animalnom modelu dokazno je da su “knockout” miševi za NRF2 u mijeloidnim stanicama izrazito podložni infekciji i sepsi te je njihovo preživljenje izrazito smanjeno<sup>260</sup>. Nadalje, visoka razina prisutnosti NRF2 zabilježena je i u Kupfferovim stanicama, koje su visokospecijalizirani makrofagi u tkivu jetre i igraju vrlo bitnu ulogu u protuupalnim odgovorima tijekom ishemijsko-reperfuzijske ozljede<sup>261</sup>. Aktivacijom NRF2 smanjuje se oštećenje hepatocita, nekroza, upala i oksidacijski stres. Prikazani rezultati potvrđuju prisutnost visoke razine izraženosti NRF2 u polimorfonuklearnim neutrofilima i Kupfferovim stanicama i u nultim i indikacijskim biopsijama, što se poklapa s literaturnim podacima.

Za pretpostaviti je kako je njegova prisutnost u nultoj biopsiji odgovor na oksidacijski stres prije transplantacije, povezan s faktorima donora (dob, spol, BMI, hemodinamska nestabilnost i sl.) i odgovor na hladnu ishemiju zbog prezervacije organa. Nakon transplantacije, njegova prisutnost je odgovor na oksidacijski stres povezan s ishemijsko-perfuzijskom ozljedom, epizodama akutnog odbacivanja i imunosupresivno liječenje. Ovo je dokaz da se NRF2 nalazi uvijek u neutrofilima i makrofagima i svim stanicama koje su prva linija obrane organizma od upale i oksidacijskog stresa. Međutim, nije dobiven odgovor zašto se NRF2 nije aktivirao u drugim stanicama parenhima jetre (hepatociti, epitel žučnih vodova, krvne žile i stroma), iako postoji značajna razina oksidacijskog stresa, što je dobar razlog da se buduća istraživanja okrenu u tom smjeru.

Iz svega gore navedenog, aktivatori NRF2 transkripcijskog faktora nametnuli su se kao potencijalne mete u liječenju pojedinih bolesti. Za sad su kliničke studije usmjerene samo na prevenciju bubrežne ozljede i bubrežnog zatajenja. Međutim, postoji veliki broj istraživanja provedenih na animalnim modelima, u kojima aktivacijom NRF2 pokušavaju prevenirati ili atenuirati ozljedu jetre<sup>262</sup>. Naravno, mehanizam kojima se aktivira NRF2 je različit u kroničnim i akutnim stanjima bolesti jetre. Upalni odgovor aktivira NRF2 u kroničnim bolestima jetre, kao što su nealkoholna masna infiltracija jetre ili nealkoholni steatohepatitis, i na taj način vrši važnu ulogu prevencije progresije kronične ozljede jetre u teži oblik bolesti. Dok u akutnom oštećenju aktivaciju NRF2 pokreće proces eliminacija toksina i njegovih metabolita, koji onda pokreću endogene posrednike, najčešće MRP porodicu (od engl. *multidrug-resistance protein*) transportnih proteina. Iz tog razloga važno je razumjeti zašto se događa varijabilnost u aktivaciji gena različitim metodama aktivacije NRF2 te kako te razlike možemo upotrijebiti u našu korist za razvoj opcija liječenja za svaku pojedinačnu bolest jetre.

Ovim radom je po prvi puta dokazana razlika u količini akroleina i HNE-a u parenhimu jetre u bolesnika s transplantacijom jetre te u povećanju/smanjenju istih u epizodama akutnog staničnog odbacivanja. Jednako tako, rad je pokazao izrazito smanjenu razinu aktivacije NRF2 signalnog puta nakon transplantacije. I ostali radovi koji su istraživali druge antioksidanse (npr. vitamin E) pokazuju smanjenu antioksidacijski zaštitu nakon transplantacije<sup>252</sup>. To nas dovodi do zaključka kako bi buduća klinička istraživanja trebala usmjeriti prema lijekovima s antioksidacijskim učinkom i istražiti da li bi ti lijekovi mogli imati ulogu u bržem oporavku presatka jetre i smanjiti incidenciju ASO. Stoga je ovaj rad vrijedan doprinos u razumijevanju mehanizama ASO. Potvrđena je uloga oksidacijskog stresa u epizodama ASO, ali je ona zavisna o etiologiji (karakteristična je za skupinu EtOH). U skupini HCV, epizode ASO su obilježene s povećanom razinom oksidacijskog stresa, međutim lipidna peroksidacija nije mehanizam preko kojeg se odvija ASO. Iz tog razloga, prilikom evaluacije epizoda ASO-a, bolesnicima moramo pristupiti individualno, odnosno obratiti pozornost na etiologiju radi koje je učinjena transplantacija jetre. Nadalje, rad je dobra podloga za daljnja istraživanja čimbenika, prognostičkih manje invazivnih biljega i pristupa liječenju za epizode ASO-a.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Akrolein i HNE prisutni su i u nultoj i u indikacijskoj biopsiji što ukazuje da bolesnici ulaze u sam akt transplantacije s povišenom razinom oksidacijskog stresa, koji zaostaje još određeni vremenski period nakon učinjene transplantacije.
2. Smanjenje pozitiviteta akroleina i HNE-a u indikacijskim biopsijama u odnosu na nultu, ukazuju kako se razina oksidacijskog stresa smanjuje tijekom vremena i prati oporavak presatka jetre.
3. Prisutnost akroleina i nedostatak HNE-a u istoj promatranoj indikacijskoj biopsiji u jezgrama hepatocita i žučnog epitela karakteristično je za alkoholnu etiologiju, bez obzira na prisutnost ili odsutnost odbacivanja.
4. Smanjenje akroleina i HNE-a u citoplazmama hepatocita u skupini HCV/ASO ukazuje na akutno stanično odbacivanje. To nam može poslužiti kao imunohistokemijski biljeg dodatne potvrde staničnog odbacivanja kod bolesnika s hepatitisom C.
5. Povećanje akroleina u skupini bez odbacivanja, bez obzira na etiologiju, u citoplazmama stanica krvnih žila i u stromi jetre ukazuje na urednu funkciju presatka, bez prisutne epizode odbacivanja.
6. Nedostatak prisutnosti pozitiviteta NRF2 u nultim i indikacijskim biopsijama je odraz izrazito snižene razine antioksidacijske zaštite u bolesnika koji pristupaju transplantaciji jetre, a nastavlja se i nakon učinjenog zahvata.
7. Izostanak aktivacije NRF2 u bolesnika s dokazanim akutnim staničnim odbacivanjem, zbog niskih razina u nultim biopsijama ne može se koristiti kao mogući biljeg odbacivanja. Dakle, antioksidacijska zaštita ne može se koristiti kao mogući razlikovni faktor između akutnog staničnog odbacivanja i recidiva virusne infekcije.
8. NRF2 je izrazito izražen u polimorfonuklearnim neutrofilima i Kupfferovim stanicama jetre što odgovara literaturnim podacima, kako smanjuje ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje, odnosno smanjuje oštećenje hepatocita, nekrozu, upalu i oksidacijski stres.
9. Rezultati analize biokemijskih parametara u ovom radu upućuju na broj leukocita kao mogući prediktivni biljeg u dijagnostici akutnog staničnog odbacivanja, što je sukladno literaturnim podacima.

**10.** Faktori povezani s akutnim staničnim odbacivanjem su mlađa životna dob i niži BMI kako primatelja tako i donora. To su parametri na koje ne možemo bitnije utjecati.

## 8. LITERATURA

1. Zarrinpar A, Busuttil RW. Liver transplantation: Past, present and future. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(7):434-440. doi:10.1038/nrgastro.2013.88.
2. Dutkowski P, De Rougemont O, Müllhaupt B, Clavien PA. Current and Future Trends in Liver Transplantation in Europe. *Gastroenterology*. 2010;138(3). doi:10.1053/j.gastro.2010.01.030.
3. Port FK, Marion RM, Roys EC WR. Trends in Organ Donation and Transplantation in the United States, 1997-2006. *A J Transpl*. 2008;8:911-921.
4. Zarrinpar A, Busuttil RW. Immunomodulating options for liver transplant patients. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(6):565-578. doi:10.1586/eci.12.47.
5. Wavamunno MD, Chapman JR. Individualization of immunosuppression: Concepts and rationale. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13(6):604-608. doi:10.1097/MOT.0b013e3283193bc5.
6. Monaco AP. The beginning of clinical tolerance in solid organ allografts. *Exp Clin Transplant*. 2004;2(1):153-161. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15859922/>. Accessed August 2, 2020.
7. Fung JJ. Toward tolerance: Lessons learned from liver transplantation. In: *Liver Transplantation and Surgery*. Vol 5. Liver Transpl Surg; 1999. doi:10.1053/JTLS005s00090.
8. Tisone G, Orlando G, Angelico M. Operational tolerance in clinical liver transplantation: Emerging developments. *Transpl Immunol*. 2007;17(2):108-113. doi:10.1016/j.trim.2006.09.021.
9. Varo Pérez E, Castroagudín JF. The Future of Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2010;42(2):613-616. doi:10.1016/j.transproceed.2010.02.003.
10. Brusich KT, Acan I, Filipic NV, Gustin D. Liver transplantation: An adventure for the anaesthesiologist. *OA Anaesth*. 2013;1(2):11.
11. Adam R, Karam V, Delvart V, et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol*. 2012;57(3):675-688. doi:10.1016/j.jhep.2012.04.015.
12. Åberg F, Isoniemi H, Höckerstedt K. Long-Term results of liver transplantation. *Scand J Surg*. 2011;100(1):14-21. doi:10.1177/145749691110000104.
13. Eurotransplant. [www.eurotransplant.org](http://www.eurotransplant.org).
14. Asrani SK, Kim WR. Model for End-Stage Liver Disease: End of the First Decade. *Clin Liver Dis*. 2011;15(4):685-698. doi:10.1016/j.cld.2011.08.009.
15. Habib S, Berk B, Chang CCH, et al. MELD and prediction of post-liver transplantation survival. *Liver Transplant*. 2006;12(3):440-447. doi:10.1002/lt.20721.
16. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003;124(1):91-96. doi:10.1053/gast.2003.50016.
17. Kim WR, Biggins SW, Kremers WK, et al. Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *N Engl J Med*. 2008;359(10):1018-1026.

- doi:10.1056/NEJMoa0801209.
18. Clavien PA, Lesurtel M, Bossuyt PMM, Gores GJ, Langer B, Perrier A. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: An international consensus conference report. *Lancet Oncol.* 2012;13(1). doi:10.1016/S1470-2045(11)70175-9.
  19. Bruzzone P, Giannarelli D, Nunziale A, et al. Extended criteria liver donation and transplant recipient consent: The European experience. *Transplant Proc.* 2011;43(4):971-973. doi:10.1016/j.transproceed.2011.01.145.
  20. Silberhumer GR, Rahmel A, Karam V, et al. The difficulty in defining extended donor criteria for liver grafts: The Eurotransplant experience. *Transpl Int.* 2013;26(10):990-998. doi:10.1111/tri.12156.
  21. Lai Q, Melandro F LSG. Use of elderly donors for liver transplantation: has the limit been reached? *J Gastrointest Liver Dis.* 2011;20(4):383-387.
  22. Niu Y, Chen X, Feng L, et al. Anti-HBc-positive/HBsAg-negative liver donors pose a higher risk of occult HBV infection but do not cause severe histological damage in liver grafts. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014;38(4):475-480. doi:10.1016/j.clinre.2014.03.016.
  23. Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, et al. Characteristics associated with liver graft failure: The concept of a donor risk index. *Am J Transplant.* 2006;6(4):783-790. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01242.x.
  24. Akkina SK, Asrani SK, Peng Y, Stock P, Kim WR, Israni AK. Development of organ-specific donor risk indices. *Liver Transplant.* 2012;18(4):395-404. doi:10.1002/lt.23398.
  25. Guštin D. Anestezija pri kirurškim zahvatima na jetri. In: *Klinička Anesteziologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2013:817-831.
  26. Varma V, Mehta N, Kumaran V, Nundy S. Indications and contraindications for liver transplantation. *Int J Hepatol.* 2011;2011:121862. doi:10.4061/2011/121862.
  27. Lee WM. Acute Liver Failure. *N Engl J Med.* 1993;329(25):1862-1872. doi:10.1056/NEJM199312163292508.
  28. Neuberger J, Schulz KH, Day C, et al. Transplantation for alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2002;36(1):130-137. doi:10.1016/S0168-8278(01)00278-1.
  29. Curry MP. Hepatitis B and hepatitis C viruses in liver transplantation. *Transplantation.* 2004;78(7):955-963. doi:10.1097/01.TP.0000140927.63952.58.
  30. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(1):3-16. doi:10.1055/s-0030-1247128.
  31. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology.* 2001;33(6):1394-1403. doi:10.1053/jhep.2001.24563.
  32. Klein AS. Management of Budd-Chiari syndrome. *Liver Transpl.* 2006;12(11 Suppl 2):S23-S28. doi:10.1002/lt.20941.
  33. Lim JK, Keeffe EB. Liver transplantation for alcoholic liver disease: Current concepts and length of sobriety. *Liver Transplant.* 2004;10(S10):S31-S38. doi:10.1002/lt.20267.
  34. Keswani RN, Ahmed A, Keeffe EB. Older age and liver transplantation: A review. *Liver Transplant.* 2004;10(8):957-967. doi:10.1002/lt.20155.
  35. Ahmed A, Keeffe EB. Current Indications and Contraindications for Liver Transplantation. *Clin Liver Dis.* 2007;11(2):227-247. doi:10.1016/j.cld.2007.04.008.
  36. Pillai AA, Levitsky J. Overview of immunosuppression in liver transplantation. *World J*

- Gastroenterol.* 2009;15(34):4225-4233. doi:10.3748/wjg.15.4225.
37. Kotru A, Sheperd R, Nadler M, Chapman W, Huddleston C, Lowell J. Combined lung and liver transplantation: The United States experience [5]. *Transplantation.* 2006;82(1):144-145. doi:10.1097/01.tp.0000227923.85536.2f.
  38. Rasmussen A, Davies HF, Jamieson NV, Evans DB CR. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation.* 1995;59:919-921.
  39. Geissler EK, Schlitt HJ. Immunosuppression for liver transplantation. *Gut.* 2009;58(3):452-463. doi:10.1136/gut.2008.163527.
  40. Mazariegos G V., Reyes J, Marino IR, et al. Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation.* 1997;63(2):243-249. doi:10.1097/00007890-199701270-00012.
  41. Girlanda R, Rela M, Williams R, O'Grady JG, Heaton ND. Long-term outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. In: *Transplantation Proceedings.* Vol 37. Transplant Proc; 2005:1708-1709. doi:10.1016/j.transproceed.2005.03.070.
  42. Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, et al. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation.* 2001;72(3):449-454. doi:10.1097/00007890-200108150-00016.
  43. Eason JD, Cohen AJ, Nair S, Alcantera T, Loss GE. Tolerance: Is it worth the risk? In: *Transplantation.* Vol 79. Transplantation; 2005:1157-1159. doi:10.1097/01.TP.0000162084.46555.10.
  44. Hamawy MM. Molecular actions of calcineurin inhibitors. *Drug News Perspect.* 2003;16(5):277-282. doi:10.1358/dnp.2003.16.5.829315.
  45. Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant.* 1996;10(1 Pt 2):77-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8680053>. Accessed August 4, 2020.
  46. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology.* 2000;47(2-3):85-118. doi:10.1016/S0162-3109(00)00188-0.
  47. Ventura-Aguiar P, Campistol JM, Diekmann F. Safety of mTOR inhibitors in adult solid organ transplantation. *Expert Opin Drug Saf.* 2016;15(3):303-319. doi:10.1517/14740338.2016.1132698.
  48. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids. Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016;42(1):15-31. doi:10.1016/j.rdc.2015.08.002.
  49. Bush WW. Overview of transplantation immunology and the pharmacotherapy of adult solid organ transplant recipients: focus on immunosuppression. *AACN Clin Issues.* 1999;10(2):253-269; quiz 304. doi:10.1097/00044067-199905000-00011.
  50. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;56(1 SPEC. ISS.):23-46. doi:10.1016/j.critrevonc.2005.03.012.
  51. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: Risk of development and treatment. *Transplantation.* 2001;72(12):1934-1939. doi:10.1097/00007890-200112270-00012.
  52. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med.* 2003;349(10):931-940. doi:10.1056/NEJMoa021744.

53. Jain A, Marcos A, Reyes J, et al. Tacrolimus for primary liver transplantation: 12 to 15 Years actual follow-up with safety profile. In: *Transplantation Proceedings*. Vol 37. Elsevier USA; 2005:1207-1210. doi:10.1016/j.transproceed.2004.12.077.
54. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: A moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018;131(1):58-67. doi:10.1182/blood-2017-06-741033.
55. Yolcu ES, Shirwan H, Askenasy N. Mechanisms of tolerance induction by hematopoietic chimerism: The immune perspective. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(3):700-712. doi:10.1002/sctm.16-0358.
56. Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory networks - A review. *Liver Transplant*. 2010;16(9):1016-1032. doi:10.1002/lt.22117.
57. Saidi RF, Kenari SKH. Liver ischemia/reperfusion injury: An overview. *J Investig Surg*. 2014;27(6):366-379. doi:10.3109/08941939.2014.932473.
58. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008;245(3):194-205. doi:10.1016/j.tox.2007.11.021.
59. Curry MP. Systematic investigation of elevated transaminases during the third posttransplant month. *Liver Transplant*. 2013;19(SUPPL. 2). doi:10.1002/lt.23737.
60. García-Criado A, Gilabert R, Nicolau C, et al. Early detection of hepatic artery thrombosis after liver transplantation by Doppler ultrasonography: Prognostic implications. *J Ultrasound Med*. 2001;20(1):51-58. doi:10.7863/jum.2001.20.1.51.
61. Uzochukwu LN, Bluth EI, Smetherman DH, et al. Early postoperative hepatic sonography as a predictor of vascular and biliary complications in adult orthotopic liver transplant patients. *Am J Roentgenol*. 2005;185(6):1558-1570. doi:10.2214/AJR.04.1258.
62. González FX, Rimola A, Grande L, et al. Predictive factors of early postoperative graft function in human liver transplantation. *Hepatology*. 1994;20(3):565-573. doi:10.1002/hep.1840200304.
63. Oliver JH III, Federle MP, Campbell WL ZA. Imaging the hepatic transplant. *Radiol Clin North Am*. 1991;29:1285-1298.
64. Dodd GD, Memel DS, Zajko AB, Baron RL, Santaguida LA. Hepatic artery stenosis and thrombosis in transplant recipients: Doppler diagnosis with resistive index and systolic acceleration time. *Radiology*. 1994;192(3):657-661. doi:10.1148/radiology.192.3.8058930.
65. Adeyi O, Fischer SE, Guindi M. Liver allograft pathology: approach to interpretation of needle biopsies with clinicopathological correlation. *J Clin Pathol*. 2010;63(1):47-74. doi:10.1136/jcp.2009.068254.
66. Portmann B. Liver allograft pathology and biopsy interpretation. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 2004;88:29-38.
67. Shahbazi N, Haeri H, Toosi MN, et al. Correlation of histopathologic findings of non-graft threatening preservation/reperfusion injury in time-zero liver needle biopsies with short-term post-transplantation laboratory alterations. *Hepat Mon*. 2015;15(6):30008. doi:10.5812/hepatmon.30008v2.
68. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology*. 25:658-663. doi:10.1002/hep.510250328.
69. Demetris A, Adams D, Bellamy C, et al. Update of the international Banff schema for liver allograft rejection: Working recommendations for the histopathologic staging and



- reporting of chronic rejection. In: *Hepatology*. Vol 31. W.B. Saunders; 2000:792-799. doi:10.1002/hep.510310337.
70. Neil DAH, Hübscher SG. Current views on rejection pathology in liver transplantation. *Transpl Int*. 2010;23(10):971-983. doi:10.1111/j.1432-2277.2010.01143.x.
  71. Schmeding M, Dankof A, Krenn V, et al. C4d in acute rejection after liver transplantation - A valuable tool in differential diagnosis to hepatitis C recurrence. *Am J Transplant*. 2006;6(3):523-530. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.01180.x.
  72. O'Grady JG. Phenotypic expression of recurrent disease after liver transplantation: Minireview. *Am J Transplant*. 2010;10(5):1149-1154. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03080.x.
  73. Capron A, Lerut J, Latinne D, Rahier J, Haufroid V, Wallemacq P. Correlation of tacrolimus levels in peripheral blood mononuclear cells with histological staging of rejection after liver transplantation: Preliminary results of a prospective study. *Transpl Int*. 2012;25(1):41-47. doi:10.1111/j.1432-2277.2011.01365.x.
  74. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(10):623-653. doi:10.2165/00003088-200443100-00001.
  75. Frohn C, Fricke L, Puchta JC, Kirchner H. The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(2):355-360. doi:10.1093/ndt/16.2.355.
  76. Clarkson MR, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation*. 2005;80(5):555-563. doi:10.1097/01.tp.0000168432.60022.99.
  77. Krupnick AS, Kreisel D, Popma SH, et al. Mechanism of T cell-mediated endothelial apoptosis. *Transplantation*. 2002;74(6):871-876. doi:10.1097/00007890-200209270-00022.
  78. Kitchens WH, Uehara S, Chase CM, Colvin RB, Russell PS, Madsen JC. The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance. *Transplantation*. 2006;81(6):811-817. doi:10.1097/01.tp.0000202844.33794.0e.
  79. McNerney ME, Lee KM, Zhou P, et al. Role of natural killer cell subsets in cardiac allograft rejection. *Am J Transplant*. 2006;6(3):505-513. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.01226.x.
  80. Möller E, Söderberg-Nauclér C, Sumitran-Karuppan S. Role of alloimmunity in clinical transplantation. *Rev Immunogenet*. 1999;1(3):309-322.
  81. Sumitran-Holgersson S. HLA-specific alloantibodies and renal graft outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(5):897-904. doi:10.1093/ndt/16.5.897.
  82. Ekser B, Rigotti P, Gridelli B, Cooper DKC. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transpl Immunol*. 2009;21(2):87-92. doi:10.1016/j.trim.2008.10.005.
  83. O'Leary JG, Klintmalm GB. Impact of donor-specific antibodies on results of liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(3):279-284. doi:10.1097/MOT.0b013e3283614a10.
  84. Ruiz R, Tomiyama K, Campsen J, et al. Implications of a positive crossmatch in liver transplantation: A 20-year review. *Liver Transplant*. 2012;18(4):455-460. doi:10.1002/lt.22474.
  85. Hickman PE, Potter JM, Pesce AJ. Clinical chemistry and post-liver-transplant monitoring. *Clin Chem*. 1997;43(8 Pt 2):1546-1554.

86. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2000;69(3):319-326. doi:10.1097/00007890-200002150-00001.
87. Trentadue G, Dijkstra G. Current understanding of alloimmunity of the intestinal graft. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(3):286-294. doi:10.1097/MOT.000000000000196.
88. Lan X, Liu MG, Chen HX, et al. Efficacy of immunosuppression monotherapy after liver transplantation: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(34):12330-12340. doi:10.3748/wjg.v20.i34.12330.
89. Sgourakis G, Dedemadi G. Corticosteroid-free immunosuppression in liver transplantation: An evidence-based review. *World J Gastroenterol*. 2014;20(31):10703-10714. doi:10.3748/wjg.v20.i31.10703.
90. Živčić-Čosić S, Trobonjača Z, Sladoje-Martinović B, Orlić L. *Komplikacije Nakon Presađivanja Bubrege*. Vol 46. Hrvatski liječnički zbor, Podružnica Rijeka; 2010. <http://hrcak.srce.hr/medicinamedicinafluminensis>. Accessed August 5, 2020.
91. Vos R, Verleden SE, Verleden GM. Chronic lung allograft dysfunction: Evolving practice. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(5):483-491. doi:10.1097/MOT.0000000000000236.
92. Hübscher SG. What is the long-term outcome of the liver allograft? *J Hepatol*. 2011;55(3):702-717. doi:10.1016/j.jhep.2011.03.005.
93. Shetty S, Adams DH, Hubscher SG. Post-transplant liver biopsy and the immune response: Lessons for the clinician. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(7):645-661. doi:10.1586/eci.12.65.
94. Markiewicz-Kijewska M, Kaliciński P, Kluge P, et al. Immunological factors and liver fibrosis in pediatric liver transplant recipients. *Ann Transplant*. 2015;20:279-284. doi:10.12659/AOT.892544.
95. Au KP, Chan SC, Chok KSH, et al. Clinical factors affecting rejection rates in liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015;14(4):367-373. doi:10.1016/S1499-3872(15)60391-5.
96. Aigner C. Retransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(5):521-526. doi:10.1097/MOT.0000000000000237.
97. Kitchens WH, Yeh H, Markmann JF. Hepatic Retransplant. What Have We Learned? *Clin Liver Dis*. 2014;18(3):731-751. doi:10.1016/j.cld.2014.05.010.
98. Quiroga J, Colina I, Demetris AJ, Starzl TE, Van Thiel DH. Cause and timing of first allograft failure in orthotopic liver transplantation: a study of 177 consecutive patients. *Hepatol I*. 1992;14:1054-1062.
99. Nagral A, Ben-Ari Z, Dhillon AP, Burroughs AK. Eosinophils in acute cellular rejection in liver allografts. *Liver Transplant Surg*. 1998;4(5):355-362. doi:10.1002/lt.500040503.
100. Nagral A, Quaglia A, Sabin CA, et al. Blood and graft eosinophils in acute cellular rejection of liver allografts. *Transplant Proc*. 2001;33(4):2588-2593. doi:10.1016/S0041-1345(01)02105-4.
101. Dollinger MM, Plevris JN, Bouchier IAD, Harrison DJ, Hayes PC. Peripheral eosinophil count both before and after liver transplantation predicts acute cellular rejection. *Liver Transplant Surg*. 1997;3(2):112-117. doi:10.1002/lt.500030203.
102. Germani G, Rodriguez-Castro K, Russo FP, et al. Markers of acute rejection and graft acceptance in liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2015;21(4):1061-1068.

- doi:10.3748/wjg.v21.i4.1061.
103. Raschzok N, Reutzel-Selke A, Schmuck RB, et al. CD44 and CXCL9 serum protein levels predict the risk of clinically significant allograft rejection after liver transplantation. *Liver Transplant*. 2015;21(9):1195-1207. doi:10.1002/lt.24164.
  104. Ormonde DG, De Boer WB, Kierath A, et al. Banff schema for grading liver allograft rejection: Utility in clinical practice. *Liver Transplant Surg*. 1999;5(4):261-268. doi:10.1002/lt.500050418.
  105. Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, et al. Acute hepatic allograft rejection: Incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology*. 1998;28(3):638-645. doi:10.1002/hep.510280306.
  106. Samonakis DN, Germani G, Burroughs AK. Immunosuppression and HCV recurrence after liver transplantation. *J Hepatol*. 2012;56(4):973-983. doi:10.1016/j.jhep.2011.06.031.
  107. Maluf DG, Stravitz RT, Cotterell AH, et al. Adult living donor versus deceased donor liver transplantation: A 6-year single center experience. *Am J Transplant*. 2005;5(1):149-156. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00654.x.
  108. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med*. 2000;342(17):1266-1271. doi:10.1056/NEJM200004273421707.
  109. Volpin R, Angeli P, Galioto A, et al. Comparison between two high-dose methylprednisolone schedules in the treatment of acute hepatic cellular rejection in liver transplant recipients: A controlled clinical trial. *Liver Transplant*. 2002;8(6):527-534. doi:10.1053/jlts.2002.33456.
  110. Tippner C, Nashan B, Hoshino K, et al. Clinical and subclinical acute rejection early after liver transplantation: Contributing factors and relevance for the long-term course. *Transplantation*. 2001;72(6):1122-1128. doi:10.1097/00007890-200109270-00024.
  111. Carswell CI, Plosker GL, Wagstaff AJ. Daclizumab: A review of its use in the management of organ transplantation. *BioDrugs*. 2001;15(11):745-773. doi:10.2165/00063030-200115110-00005.
  112. Swiatecka-Urban A. Anti-Interleukin-2 Receptor Antibodies for the Prevention of Rejection in Pediatric Renal Transplant Patients: Current Status. *Pediatr Drugs*. 2003;5(10):699-716. doi:10.2165/00148581-200305100-00005.
  113. Cavlek TV, Margan IG, Lepej SZ, Kolaric B, Vince A. Seroprevalence, risk factors, and hepatitis C virus genotypes in groups with high-risk sexual behavior in Croatia. *J Med Virol*. 2009;81(8):1348-1353. doi:10.1002/jmv.21530.
  114. Rosen HR. Chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2429-2438. doi:10.1056/NEJMcp1006613.
  115. Furčić I, Planinić A, Židovec-Lepej S, et al. Genetic diversity of hepatitis C virus in Croatia. *17th Int Meet Hepat C Virus Relat Viruses*. 2010. <https://www.bib.irb.hr/541167>. Accessed August 6, 2020.
  116. Vince A, Iščić-Beš J, Židovec Lepej S et al. Distribucija genotipova hepatitis C virusa u Hrvatskoj: desetogodišnje retrospektivno istraživanje u četiri regije. In: Škerk V (ur. ., ed. 9. *Simpozij O Spolno-Prenosivim Bolestima I Urogenitalnim Infekcijama, Simpozij Slavka Schonwalda*. Zagreb: Intergraf-BI; 2007:82-82.
  117. Szabo G, Wands JR, Eken A, et al. Alcohol and hepatitis C virus-interactions in immune dysfunctions and liver damage. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010;34(10):1675-1686. doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01255.x.

118. Wong MT, Chen SSL. Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(1):11-35. doi:10.1038/cmi.2014.127.
119. Diamond MS. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunol Cell Biol*. 2003;81(3):196-206. doi:10.1046/j.1440-1711.2003.01157.x.
120. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol*. 2014;61(1):S14-S25. doi:10.1016/j.jhep.2014.06.035.
121. Yang DR, Zhu HZ. Hepatitis C virus and antiviral innate immunity: Who wins at tug-of-war? *World J Gastroenterol*. 2015;21(13):3786-3800. doi:10.3748/wjg.v21.i13.3786.
122. Asaoka T, Kato T, Marubashi S, et al. Differential transcriptome patterns for acute cellular rejection in recipients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transplant*. 2009;15(12):1738-1749. doi:10.1002/lt.21883.
123. Casino C, Lilli D, Rivanera D, et al. Recurrence of hepatitis C virus infection after orthotopic liver transplantation: role of genotypes. *New Microbiol*. 22(1):11-18.
124. Grassi A, Ballardini G. Post-liver transplant hepatitis C virus recurrence: An unresolved thorny problem. *World J Gastroenterol*. 2014;20(32):11095-11115. doi:10.3748/wjg.v20.i32.11095.
125. DeLemos AS, Schmeltzer PA, Russo MW. Recurrent hepatitis C after liver transplant. *World J Gastroenterol*. 2014;20(31):10668-10681. doi:10.3748/wjg.v20.i31.10668.
126. Regev A, Molina E, Moura R, et al. Reliability of histopathologic assessment for the differentiation of recurrent hepatitis C from acute rejection after liver transplantation. *Liver Transplant*. 2004;10(10):1233-1239. doi:10.1002/lt.20245.
127. Berenguer M, Crippin J, Gish R, et al. A model to predict severe HCV-related disease following liver transplantation. *Hepatology*. 2003;38(1):34-41. doi:10.1053/jhep.2003.50278.
128. Berenguer M, Prieto M, Córdoba J, et al. Early development of chronic active hepatitis in recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation: Association with treatment of rejection. *J Hepatol*. 1998;28(5):756-763. doi:10.1016/S0168-8278(98)80224-9.
129. Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E, et al. Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 1995;21(1):30-34.
130. Boix-Giner F, Millan O, San Segundo D, et al. High frequency of central memory regulatory T cells allows detection of liver recipients at risk of early acute rejection within the first month after transplantation. *Int Immunol*. 2015;28(2):55-64. doi:10.1093/intimm/dxv048.
131. Gehrau R, Mas V, Archer K, Maluf D. Biomarkers of disease differentiation: HCV recurrence versus acute cellular rejection. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5 Suppl 1(Suppl 1):S11. doi:10.1186/1755-1536-5-S1-S11.
132. Gehrau RC, Mas VR, Suh JL, Maluf DG. Liver transplant complications in hepatitis C infected recipients: recurrence versus rejection. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;8(5):453-456. doi:10.1586/17474124.2014.898562.
133. Adly AAM. Oxidative stress and disease: An updated review. *Res J Immunol*. 2010;3(2):129-145. doi:10.3923/rji.2010.129.145.
134. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
135. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and

- aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):222-230. doi:10.1016/S0891-5849(00)00317-8.
136. Rahal A, Kumar A, Singh V, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/761264.
  137. Guetens G, De Boeck G, Highley M, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Oxidative DNA damage: Biological significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2002;39(4-5):331-457. doi:10.1080/10408360290795547.
  138. Davies M. Free radicals, oxidants and protein damage. *Aust Biochem*. 2012;43(1):8-12.
  139. Verhelst XPD, Troisi RI, Colle I, Geerts A, Van Vlierberghe H. Biomarkers for the diagnosis of acute cellular rejection in liver transplant recipients: A review. *Hepatol Res*. 2013;43(2):165-178. doi:10.1111/hepr.12012.
  140. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol*. 2013;1(1):483-491. doi:10.1016/j.redox.2013.07.006.
  141. Živković M, Žarković K, Škrinjar Lj, et al. A New Method for Detection of HNE-histidine Conjugates in Rat Inflammatory Cells. *Croat Chem Acta*. 2005;78(1):91-98.
  142. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81-128. doi:10.1016/0891-5849(91)90192-6.
  143. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*. 2010;44(10):1098-1124. doi:10.3109/10715762.2010.498477.
  144. Dix TA, Aikens J. Mechanisms and Biological Relevance of Lipid Peroxidation Initiation. *Chem Res Toxicol*. 1993;6(1):2-18. doi:10.1021/tx00031a001.
  145. Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(5):779-785. doi:10.1093/ajcn/57.5.779S.
  146. Uchida K. Future of toxicology - Lipid peroxidation in the future: From biomarker to etiology. *Chem Res Toxicol*. 2007;20(1):3-5. doi:10.1021/tx600304n.
  147. Stevens JF, Maier CS. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(1):7-25. doi:10.1002/mnfr.200700412.
  148. Zarkovic N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. In: *Molecular Aspects of Medicine*. Vol 24. Elsevier Ltd; 2003:281-291. doi:10.1016/S0098-2997(03)00023-2.
  149. Shoeb M, Ansari N, Srivastava S, Ramana K. 4-Hydroxynonenal in the Pathogenesis and Progression of Human Diseases. *Curr Med Chem*. 2013;21(2):230-237. doi:10.2174/09298673113209990181.
  150. Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress:4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ*. 2013;20(12):1615-1630. doi:10.1038/cdd.2013.138.
  151. West JD, Marnett LJ. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol*. 2006;19(2):173-194. doi:10.1021/tx050321u.
  152. Yoshikawa T, Naito Y. *What Is Oxidative Stress?* Vol 45.; 2002.
  153. Augustyniak A, Bartosz G, Čipak A, et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radic Res*. 2010;44(10):1216-1262. doi:10.3109/10715762.2010.508495.
  154. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613.

155. Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P. Nrf2-ARE stress response mechanism: A control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res*. 2010;44(11):1267-1288. doi:10.3109/10715762.2010.507670.
156. Aleksunes LM, Manautou JE. Emerging Role of Nrf2 in Protecting Against Hepatic and Gastrointestinal Disease. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):459-473. doi:10.1080/01926230701311344.
157. O'Connell MA, Hayes JD. The Keap1/Nrf2 pathway in health and disease: From the bench to the clinic. *Biochem Soc Trans*. 2015;43(4):687-689. doi:10.1042/BST20150069.
158. Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2010;690(1-2):12-23. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.09.007.
159. Jung KA, Kwak MK. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules*. 2010;15(10):7266-7291. doi:10.3390/molecules15107266.
160. Beyer TA, Xu W, Teupser D, et al. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: Role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J*. 2008;27(1):212-223. doi:10.1038/sj.emboj.7601950.
161. Beyer TA, Werner S. The cytoprotective Nrf2 transcription factor controls insulin receptor signaling in the regenerating liver. *Cell Cycle*. 2008;7(7):874-878. doi:10.4161/cc.7.7.5617.
162. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23(1):21-48. doi:10.3109/10408449309104073.
163. Knight JA. Free radicals: Their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab Sci*. 1998;28:331-346.
164. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health*. 2003;27(4):277-284. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15540798>. Accessed August 8, 2020.
165. Halliwell B GJ. Free Radicals in Biology and Medicine. In: 3rd editio. Oxford, UK: Oxford University Press; 2007.
166. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):8841-8848. doi:10.1073/pnas.97.16.8841.
167. Sorci G, Faivre B. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2009;364(1513):71-83. doi:10.1098/rstb.2008.0151.
168. Paracha UZ, Fatima K, Alqahtani M, et al. Oxidative stress and hepatitis C virus. *Virol J*. 2013;10(1). doi:10.1186/1743-422X-10-251.
169. Choi J, Ou J-HJ. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(5):G847-G851. doi:10.1152/ajpgi.00522.2005.
170. Tasdelen Fisgin N, Aydin BK, Sarikaya H, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis B. *Clin Lab*. 2012;58(3-4):273-280. <https://europepmc.org/article/med/22582501>. Accessed August 8, 2020.
171. Choi J, Lee KJ, Zheng Y, Yamaga AK, Lai MMC, Ou JH. Reactive Oxygen Species Suppress Hepatitis C Virus RNA Replication in Human Hepatoma Cells. *Hepatology*. 2004;39(1):81-89. doi:10.1002/hep.20001.
172. Gonzalez-Gallego J, V. Garcia-Mediavilla M, Sanchez-Campos S. Hepatitis C Virus,

- Oxidative Stress and Steatosis: Current Status and Perspectives. *Curr Mol Med*. 2011;11(5):373-390. doi:10.2174/156652411795976592.
173. Mahmood S, Kawanaka M, Kamei A, et al. Immunohistochemical Evaluation of Oxidative Stress Markers in Chronic Hepatitis C. *Antioxidants Redox Signal*. 2004;6(1):19-24. doi:10.1089/152308604771978318.
  174. Korenaga M, Wang T, Li Y, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem*. 2005;280(45):37481-37488. doi:10.1074/jbc.M506412200.
  175. Ivanov A V., Bartosch B, Smirnova OA, Isaguliant MG, Kochetkov SN. HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses*. 2013;5(2):439-469. doi:10.3390/v5020439.
  176. Fujinaga H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. *Oncology*. 2011;81(SUPPL. 1):11-17. doi:10.1159/000333253.
  177. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, et al. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 2001;61(11):4365-4370.
  178. Leung PSC, Rossaro L, Davis PA, et al. Antimitochondrial antibodies in acute liver failure: Implications for primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2007;46(5):1436-1442. doi:10.1002/hep.21828.
  179. Waluga M, Hartleb M. Alkoholowa choroba watroby [Alcoholic liver disease]. *Wiad Lek*. 2003;56(1-2):61-70. Polish. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12901271>.
  180. McCartney EM, Beard MR. Impact of alcohol on hepatitis C virus replication and interferon signaling. *World J Gastroenterol*. 2010;16(11):1337-1343. doi:10.3748/wjg.v16.i11.1337.
  181. Pal S, Polyak SJ, Bano N, et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1: HEPATOLOGY. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(3):627-634. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.06128.x.
  182. Younossi ZM. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(1):2-12. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03710.x.
  183. Pratico D, Iuliano L, Basili S, Ferro D, Camastra C, FitzGerald GA VF. Enhanced lipid peroxidation in hepatic cirrhosis. *J Invest Med*. 1998;46:51-57.
  184. Koningsberger JC, Marx JJM, Van Hattum J. Free radicals in gastroenterology: A review. *Scand J Gastroenterol*. 1988;23(S154):30-40. doi:10.3109/00365528809095948.
  185. Burke A, FitzGerald GA, Lucey MR. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation*. 2002;74(2):217-221. doi:10.1097/00007890-200207270-00012.
  186. Trevisani F, Caraceni P, Simoncini M, et al. Evidence of oxidative imbalance in long-term liver transplant patients. *Dig Liver Dis*. 2002;34(4):279-284. doi:10.1016/S1590-8658(02)80148-7.
  187. Corradini SG, Micheletta F, Natoli S, et al. High preoperative recipient plasma 7 $\beta$ -hydroxycholesterol is associated with initial poor graft function after liver transplantation. *Liver Transplant*. 2005;11(12):1494-1504. doi:10.1002/lt.20524.
  188. Thorat VN, Suryakar AN, Naik P, Tiwale BM. Total antioxidant capacity and lipid peroxidation in liver transplantation. *Indian J Clin Biochem*. 2009;24(1):102-104.

- doi:10.1007/s12291-009-0018-x.
189. Czubkowski P, Socha P, Pawlowska J. Oxidative stress in liver transplant recipients. *Ann Transplant*. 2011;16(1):99-108.
  190. Clavien PA, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*. 1992;53(5):957-978. doi:10.1097/00007890-199205000-00001.
  191. Miyagawa Y, Imamura H, Soeda J, et al. Fate of hepatocyte and sinusoidal lining cell function and kinetics after extended cold preservation and transplantation of the rat liver. *Liver Transplant*. 2002;8(4):370-381. doi:10.1053/jlts.2002.32281.
  192. Serrano E, Diaz J, Acosta F, Palenciano CG, Parrilla P, Carbonell LF. Oxidative stress during ischemia-reperfusion in liver transplantation. In: *Transplantation Proceedings*. Vol 32. Transplant Proc; 2000:2651. doi:10.1016/S0041-1345(00)01824-8.
  193. Rüdiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor  $\alpha$ , but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*. 2002;122(1):202-210. doi:10.1053/gast.2002.30304.
  194. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 1993;264(4 27-4). doi:10.1152/ajpgi.1993.264.4.g801.
  195. Jaeschke H. Kupffer cell-induced oxidant stress during hepatic ischemia-reperfusion: Does the controversy continue? *Hepatology*. 1999;30(6):1527-1528. doi:10.1002/hep.510300630.
  196. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest*. 1990;85(6):1936-1943. doi:10.1172/JCI114656.
  197. Vajdovich P. Free Radicals and Antioxidants in Inflammatory Processes and Ischemia-Reperfusion Injury. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 2008;38(1):31-123. doi:10.1016/j.cvsm.2007.11.008.
  198. Abd Ellah MR. The role of liver biopsy in detection of hepatic oxidative stress. *Vet Med Int*. 2011;2011:613602. doi:10.4061/2011/613602.
  199. Foster PF, Sankary HN, Hart M, Ashmann M, Williams JW. Blood and graft eosinophilia as predictors of rejection in human liver transplantation. *Transplantation*. 1989;47(1):72-74. doi:10.1097/00007890-198901000-00016.
  200. Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: The morphological and immunohistochemical studies. *Histol Histopathol*. 2006;21(1-3):301-316. doi:10.14670/HH-21.301.
  201. Wolf A, Trendelenburg CF, Diez-Fernandez C, et al. Cyclosporin A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280(3):1328-1334.
  202. Perrea DN, Moulakakis KG, Poulakou M V., Vlachos IS, Papachristodoulou A, Kostakis AI. Correlation between oxidative stress and immunosuppressive therapy in renal transplant recipients with an uneventful postoperative course and stable renal function. *Int Urol Nephrol*. 2006;38(2):343-348. doi:10.1007/s11255-006-0054-x.
  203. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, et al. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation*. 1997;64(4):594-598. doi:10.1097/00007890-199708270-00008.



204. Granot E, Elinav H, Kohen R. Markers of oxidative stress in cyclosporine-treated and tacrolimus-treated children after liver transplantation. *Liver Transplant.* 2002;8(5):469-475. doi:10.1053/jlts.2002.32716.
205. Starzl TE, Klintmalm GBG, Porter KA, Iwatsuki S, Schröter GPJ. Liver Transplantation with Use of Cyclosporin a and Prednisone. *N Engl J Med.* 1981;305(5):266-269. doi:10.1056/nejm198107303050507.
206. Shaked A, Ghobrial RM, Merion RM, et al. Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. *Am J Transplant.* 2009;9(2):301-308. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02487.x.
207. International Working Party. Terminology for hepatic allograft rejection. *Hepatology.* 1995;22:648-654.
208. Ne Sebah M, Samuel D. Short Reviews on Liver Transplantation Place of the liver biopsy in liver transplantation. doi:10.1016/j.jhep.2004.10.018.
209. Lerut JP, Pinheiro RS, Lai Q, et al. Is Minimal, [Almost] Steroid-Free immunosuppression a safe approach in adult liver transplantation? :Long-term outcome of a prospective, double blind, placebo-controlled, randomized, investigator-driven study. In: *Annals of Surgery.* Vol 260. Lippincott Williams and Wilkins; 2014:886-892. doi:10.1097/SLA.0000000000000969.
210. Rodríguez-Perálvarez M, Germani G, Papastergiou V, et al. Early tacrolimus exposure after liver transplantation: Relationship with moderate/severe acute rejection and long-term outcome. *J Hepatol.* 2013;58(2):262-270. doi:10.1016/j.jhep.2012.09.019.
211. Levitsky J, Goldberg D, Smith AR, et al. Acute Rejection Increases Risk of Graft Failure and Death in Recent Liver Transplant Recipients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(4):584-593.e2. doi:10.1016/j.cgh.2016.07.035.
212. Dogan N, Hüsing-Kabar A, Schmidt HH, Cicinnati VR, Beckebaum S, Kabar I. Acute allograft rejection in liver transplant recipients: Incidence, risk factors, treatment success, and impact on graft failure. *J Int Med Res.* 2018;46(9):3979-3990. doi:10.1177/0300060518785543.
213. Gil E, Kim JM, Jeon K, et al. Recipient Age and Mortality After Liver Transplantation: A Population-based Cohort Study. *Transplantation.* 2018;102(12):2025-2032. doi:10.1097/TP.0000000000002246.
214. McTaggart RA, Terrault NA, Vardanian AJ, Bostrom A, Feng S. Hepatitis C etiology of liver disease is strongly associated with early acute rejection following liver transplantation. *Liver Transplant.* 2004;10(8):975-985. doi:10.1002/lt.20213.
215. Kueht ML, Cotton RT, Galvan NTN, O'Mahony CA, Goss JA, Rana A. Profiling immunologic risk for acute rejection in liver transplantation: Recipient age is an important risk factor. *Transpl Immunol.* 2016;38:44-49. doi:10.1016/j.trim.2016.07.002.
216. Sladoljev I. Akutno stanično odbacivanje jetre nakon transplantacije zbog alkoholne bolesti, diplomski rad, diplomski, Medicinski fakultet, Zagreb. 2018.
217. Ostojic A, Markotic A, Kelava T, Mrzljak A. Association between CXCL9/10 polymorphisms and acute rejection of liver allograft. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(8):e14612. doi:10.1097/MD.00000000000014612.
218. Chae MS, Kim Y, Lee N, et al. Graft Regeneration and Functional Recovery in Patients with Early Allograft Dysfunction After Living-Donor Liver Transplantation. *Ann Transplant.* 2018;23:481-490. doi:10.12659/AOT.909112.

219. Gaynor JJ, Moon JI, Kato T, et al. A cause-specific hazard rate analysis of prognostic factors among 877 adults who received primary orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 2007;84(2):155-165. doi:10.1097/01.tp.0000269090.90068.0f.
220. Onaca N, Mckenna G, Testa G, Ruiz RM, Campsen J, Levy MF, Goldstein RM KG. Lower incidence of acute cellular rejection in liver transplant recipients more than 60 years of age allows minimization of immunosuppression. *Transplantation*. 2012;94:132.
221. Nunes FS, King CS, Nathan SD, et al. High Body Mass Index is a Risk Factor for Acute Cellular Rejection in Lung Transplant Recipients. *J Hear Lung Transplant*. 2018;37(4):S440-S441. doi:10.1016/j.healun.2018.01.1143.
222. Bambha KM, Dodge JL, Gralla J, Sprague D, Biggins SW. Low, rather than high, body mass index confers increased risk for post-liver transplant death and graft loss: Risk modulated by model for end-stage liver disease. *Liver Transplant*. 2015;21(10):1286-1294. doi:10.1002/lt.24188.
223. Wei Q, Wang K, Yang M, et al. Recipient gender and body mass index are associated with early acute rejection in donation after cardiac death liver transplantation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol X*. 2020;1:100004. doi:https://doi.org/10.1016/j.clirex.2020.100004.
224. Flabouris K, Chadban S, Ladhani M, Cervelli M, Clayton P. Body mass index, weight-adjusted immunosuppression and the risk of acute rejection and infection after kidney transplantation: a cohort study. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(12):2132-2143. doi:10.1093/ndt/gfz095.
225. Ayloo S, Hurton S, Cwinn M, Molinari M. Impact of body mass index on outcomes of 48281 patients undergoing first time cadaveric liver transplantation. *World J Transplant*. 2016;6(2):356. doi:10.5500/wjt.v6.i2.356.
226. Plauth M, Schütz ET. Cachexia in liver cirrhosis. *Int J Cardiol*. 2002;85(1):83-87. doi:10.1016/S0167-5273(02)00236-X.
227. Perito ER, Rhee S, Glidden D, Paul Roberts J, Rosenthal P. Impact of the donor body mass index on the survival of pediatric liver transplant recipients and Post-transplant obesity. *Liver Transplant*. 2012;18(8):930-939. doi:10.1002/lt.23438.
228. Yoshizumi T, Shirabe K, Taketomi A, et al. Risk factors that increase mortality after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2012;93(1):93-98. doi:10.1097/TP.0b013e318238dad.
229. Rustgi VK, Marino G, Halpern MT, Johnson LB, Umana WO, Tolleris C. Role of gender and race mismatch and graft failure in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transplant*. 2002;8(6):514-518. doi:10.1053/jlts.2002.33457.
230. Kaczmarek I, Meiser B, Beiras-Fernandez A, et al. Gender does matter: Gender-specific outcome analysis of 67,855 heart transplants. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;61(1):29-36. doi:10.1055/s-0032-1331467.
231. Schoening WN, Helbig M, Buescher N, et al. Gender matches in liver transplant allocation: Matched and mismatched male-female donor-recipient combinations; long-term follow-up of more than 2000 patients at a single center. *Exp Clin Transplant*. 2016;14(2):184-190. doi:10.6002/ect.2015.0211.
232. Wittnich C, Belanger MP, Askin N, Boscarino C, Wallen WJ. Lower liver transplant success in females: Gender differences in metabolic response to global ischemia. *Transplant Proc*. 2004;36(5):1485-1488. doi:10.1016/j.transproceed.2004.05.055.
233. Soric S, Belanger MP, Askin N, Wittnich C. Impact of female sex hormones on liver tissue lactic acidosis during ischemia. *Transplantation*. 2007;84(6):763-770.

- doi:10.1097/01.tp.0000280542.61123.ec.
234. Wittnich C, Tan L, Wallen J, Belanger M. Sex differences in myocardial metabolism and cardiac function: An emerging concept. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2013;465(5):719-729. doi:10.1007/s00424-013-1232-1.
  235. Syn WK, Nightingale P, Gunson B, Hubscher SG, Neuberger JM. Natural history of unexplained chronic hepatitis after liver transplantation. *Liver Transplant*. 2007;13(7):984-989. doi:10.1002/lt.21108.
  236. Candinas D, Gunson BK, McMaster P, Neuberger JM, Nightingale P, Hubscher S. Sex mismatch as a risk factor for chronic rejection of liver allografts. *Lancet*. 1995;346(8983):1117-1121. doi:10.1016/S0140-6736(95)91797-7.
  237. Abdou NI R V. Gender differences in autoimmune diseases: Immune mechanisms and clinical applications. In: (ed.) LM, ed. *Principles of Gender-Specific Medicine*. 2nd editio. San Diego: Academic Press; 2010:585-591.
  238. Tomasdottir H, Henriksson BA, Bengtson JP, Bengtsson A, Stenqvist O, Persson H. Complement activation during liver transplantation. *Transplantation*. 1993;55(4):799-802. doi:10.1097/00007890-199304000-00022.
  239. Roy AK, Chatterjee B. Sexual dimorphism in the liver. *Annu Rev Physiol*. 1983;45:37-50. doi:10.1146/annurev.ph.45.030183.000345.
  240. Krenzien F, Keshi E, Splith K, et al. Diagnostic biomarkers to diagnose acute allograft rejection after liver transplantation: Systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Front Immunol*. 2019;10:758. doi:10.3389/fimmu.2019.00758.
  241. Fa H, Lehner F, Mp M, Klempnauer J, Ciesek S. Perioperative White Blood Cell Count as a Marker for Patient and Graft Survival after Orthotopic Liver Transplantation. 2015. doi:10.4172/2475-3181.1000106.
  242. Rodríguez-Perálvarez M, De Luca L, Crespo G, et al. An objective definition for clinical suspicion of T-cell-mediated rejection after liver transplantation. *Clin Transplant*. 2017;31(7). doi:10.1111/ctr.13005.
  243. Haddad EM, McAlister VC, Renouf E, Malthaner R, Kjaer MS, Gluud LL. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(4):CD005161. doi:10.1002/14651858.CD005161.pub2.
  244. Liu Z, Chen Y, Tao R, Xv J, Meng J, Yong X. Tacrolimus-Based versus Cyclosporine-Based Immunosuppression in Hepatitis C Virus-Infected Patients after Liver Transplantation: A Meta-Analysis and Systematic Review. Aldabe R, ed. *PLoS One*. 2014;9(9):e107057. doi:10.1371/journal.pone.0107057.
  245. Clavien PD, Trotter JF, et al., ed. Rejection and immunosuppression trends in liver transplantation. In: *Medical Care of the Liver Transplant Patient*. 4th Editio. Hoboke: Wiley-Blackwell; 2012:297-311.
  246. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757-772. doi:10.2147/CIA.S158513.
  247. Nafar M, Sahraei Z, Salamzadeh J, Samavat S VN. Oxidative stress in kidney transplantation: causes, consequences, and potential treatment. *Iran J Kidney Dis*. 2011;5(6):357-372.
  248. Vural A, Yilmaz MI, Caglar K, et al. Assessment of oxidative stress in the early posttransplant period: Comparison of cyclosporine A and tacrolimus-based regimens. *Am J Nephrol*. 2005;25(3):250-255. doi:10.1159/000086079.
  249. Senoner T, Schindler S, Stättner S, Öfner D, Troppmair J, Primavesi F. Associations of

- Oxidative Stress and Postoperative Outcome in Liver Surgery with an Outlook to Future Potential Therapeutic Options. Carnevale R, ed. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3950818. doi:10.1155/2019/3950818.
250. Perrea DN, Moulakakis KG, Poulakou M V., Vlachos IS, Papachristodoulou A, Kostakis AI. Correlation between oxidative stress and immunosuppressive therapy in renal transplant recipients with an uneventful postoperative course and stable renal function. *Int Urol Nephrol*. 2006;38(2):343-348. doi:10.1007/s11255-006-0054-x.
  251. Freitas ACT, Matos DMN, Milsted JAT, Coelho JCU. EFFECTS OF COLD ISCHEMIA TIME ON HEPATIC ALLOGRAFT FUNCTION. *Arq Bras Cir Dig*. 2017;30(4):239-243. doi:10.1590/0102-6720201700040003.
  252. Augusto VS, Rodrigues AJ, Reis GS, et al. Evaluation of oxidative stress in the late postoperative stage of liver transplantation. *Transplant Proc*. 2014;46(5):1453-1457. doi:10.1016/j.transproceed.2013.12.058.
  253. Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal-protein adducts: A reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. *Mol Aspects Med*. 2008;29(1-2):67-71. doi:10.1016/j.mam.2007.09.016.
  254. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol*. 2002;37(1):56-62. doi:10.1016/S0168-8278(02)00073-9.
  255. Podszun MC, Chung JY, Ylaya K, Kleiner DE, Hewitt SM, Rotman Y. 4-HNE Immunohistochemistry and Image Analysis for Detection of Lipid Peroxidation in Human Liver Samples Using Vitamin E Treatment in NAFLD as a Proof of Concept. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(9):635-643. doi:10.1369/0022155420946402.
  256. Chen ZH, Saito Y, Yoshida Y, Sekine A, Noguchi N, Niki E. 4-Hydroxynonenal induces adaptive response and enhances PC12 cell tolerance primarily through induction of thioredoxin reductase 1 via activation of Nrf2. *J Biol Chem*. 2005;280(51):41921-41927. doi:10.1074/jbc.M508556200.
  257. Huang Y, Li W, Kong ANT. Anti-oxidative stress regulator NF-E2-related factor 2 mediates the adaptive induction of antioxidant and detoxifying enzymes by lipid peroxidation metabolite 4-hydroxynonenal. *Cell Biosci*. 2012;2(1). doi:10.1186/2045-3701-2-40.
  258. Joseph M, Haydari S, Ranganna K, Newaz MA, Yousefipour Z. ROS-mediated NRF2 Activity in Rats Exposed to Acrolein. *FASEB J*. 2019;33(S1):542.16-542.16. doi:10.1096/FASEBJ.2019.33.1\_SUPPLEMENT.542.16.
  259. Feng Z, Liu Z, Li X, et al.  $\alpha$ -Tocopherol is an effective Phase II enzyme inducer: Protective effects on acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human retinal pigment epithelial cells. *J Nutr Biochem*. 2010;21(12):1222-1231. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.10.010.
  260. Joshi N, Werner S. Nrf2 is highly expressed in neutrophils, but myeloid cell-derived Nrf2 is dispensable for wound healing in mice. *PLoS One*. 2017;12(10). doi:10.1371/journal.pone.0187162.
  261. Lee L-Y, Zhang L, Johnson JA, Werner S, Foley DP. Overexpression of the Nrf2-Antioxidant Response Element (ARE) pathway in Kupffer Cells (KC) Ameliorates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *J Am Coll Surg*. 2014;219(3):S141-S142. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2014.07.341.
  262. Bataille AM, Manautou JE. Nrf2 a potential target for new therapeutics in liver disease.

*Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(3):340-348. doi:10.1038/clpt.2012.110.

## 9. SAŽETAK

Transplantacija jetre još uvijek je najuspješnija metoda liječenja bolesnika s ireverzibilnim akutnim ili kroničnim zatajenjem jetre. Unatoč unapređenju imunosupresivnih protokola i činjenici da se radi o imunoprivilegiranom organu, akutno stanično odbacivanje je još uvijek česta komplikacija nakon transplantacije jetre. Javlja se u 10% do 30% primatelja, najčešće unutar par mjeseci od transplantacije. Oksidacijski stres sudjeluje u patogenezi nastanka niza bolesti i karcinoma, a evidentna je i njegova uloga u transplantaciji jetre. Primatelji presatka jetre imaju povećani rizik od oksidacijskog stresa zbog već postojećeg zatajenja jetre, ishemijsko-reperfuzijske ozljede, mogućeg funkcionalnog zatajenja presatka i uvođenja imunosupresivnog liječenja. Međutim, do sad je nedovoljno istražena njegova uloga u odbacivanju presatka. Zlatni standard u dijagnostici odbacivanja je biopsija jetre, iako u bolesnika s hepatitisom C može doći do preklapanja patohistološke slike akutnog staničnog odbacivanja i recidiva virusne bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti ulogu biljega oksidacijskog stresa u akutnom staničnom odbacivanju. U istraživanje je uključeno ukupno 40 bolesnika s transplantacijom jetre u razdoblju od 2005. do 2015. godine, od toga 22 bolesnika s etil cirozom i 18 bolesnika s hepatitisom C cirozom. Istraživanje se sastojalo od imunohistokemijske analize prisutnosti akroleina i 4-hidroksinonenala (HNE) te NRF2 signalnog puta u nultim i indikacijskim biopsijama jetre. Čimbenici povezani s akutnim staničnim odbacivanjem su mlađa životna dob i niži BMI kako primatelja tako i donora. Akrolein i HNE prisutni su i u nultoj i u indikacijskoj biopsiji što ukazuje da bolesnici ulaze u sam akt transplantacije s povišenom razinom oksidacijskog stresa. Smanjenje pozitiviteta akroleina i HNE-a u indikacijskim biopsijama u odnosu na nultu, ukazuju kako se razina oksidacijskog stresa smanjuje tijekom vremena i prati oporavak presatka jetre. Prisutnost akroleina i odsutnost HNE-a u istoj promatranoj indikacijskoj biopsiji u jezgrama hepatocita i epitelu žučnih vodova karakteristično je za etiologiju, konkretno za skupinu EtOH, bez obzira na prisutnost ili odsutnost ASO. Smanjenje akroleina i HNE-a u citoplazmama hepatocita u skupini HCV ukazuje na akutno stanično odbacivanje, što nam može poslužiti kao imunohistokemijski biljeg dodatne potvrde staničnog odbacivanja kod bolesnika s hepatitisom C. Povećanje akroleina u skupini bez odbacivanja, bez obzira na etiologiju, u citoplazmama stanica krvnih žila i u stromi jetre ukazuje na urednu funkciju presatka, bez prisutne epizode odbacivanja. Nedostatak prisutnosti pozitiviteta NRF2 u nultim i indikacijskim biopsijama je odraz izrazito snižene razine antioksidacijske zaštite u bolesnika koji pristupaju transplantaciji jetre, a nastavlja se i nakon učinjenog zahvata. Izostanak aktivacije NRF2 u bolesnika s dokazanim akutnim staničnim odbacivanjem, zbog niskih razina u nultim biopsijama ne može se koristiti kao mogući biljeg odbacivanja, niti kao mogući razlikovni faktor između akutnog staničnog odbacivanja i recidiva virusne infekcije. NRF2 je izrazito izražen u polmorfonuklearnim neutrofilima i Kupfferovim stanicama jetre, što odgovara literaturnim podacima. Rezultati ove studije podupiru ulogu oksidacijskog stresa u patogenezi akutnog staničnog odbacivanja. Stoga, ova studija može pomoći u daljnjim istraživanjima koja će

doprinijeti boljoj dijagnostici akutnog staničnog odbacivanja te olakšati i usmjeriti liječenje u kliničkoj praksi.

## 10. SUMMARY

Liver transplantation remains the most successful treatment for patients with irreversible acute or chronic liver failure. Despite advances in immunosuppressive protocols and the fact that it is an immunoprivileged organ, acute cellular rejection (ACR) is still a common complication after liver transplantation. ACR occurs in 10% to 30% of recipients, most often within a few months of transplantation. Oxidative stress is an important factor in the pathogenesis of various diseases and cancer, but it also has role in liver transplantation. Liver transplant recipients are at increased risk of oxidative stress due to pre-existing liver failure, ischemia-reperfusion injury, and possible functional impairment of graft, rejection and immunosuppression. However, its role in graft rejection has been insufficiently investigated so far. Liver biopsy still remains the gold standard for rejection diagnosis, although in patients with hepatitis C the histopathological features of rejection and recurrence of viral disease may overlap. The aim of this study was to investigate the role of biomarkers of oxidative stress in acute cellular rejection. The study included a total of 40 patients with liver transplantation in the period from 2005 to 2015, of which 22 patients with ethyl cirrhosis and 18 patients with hepatitis C cirrhosis. We analysed acrolein, 4-hydroxynonenal (HNE) and NRF2 signalling pathway presence in the initial and indicative liver biopsies. Factors associated with acute cellular rejection are younger age and lower BMI of both recipient and donor. Acrolein and HNE are present in both, initial and indicative biopsies, leading to conclusion that patients who undergo liver transplantation exert elevated oxidative stress levels, while a decrease in acrolein and HNE in indicative biopsies indicated decrease in oxidative stress over time thereby reflecting liver graft recovery. Concurrent presence of acrolein and the absence of HNE in the same observed indicative biopsy in nuclei of hepatocytes and biliary epithelial cells is specific for the etiology, namely, for the EtOH group, regardless of the status of transplant rejection. Decrease of acrolein and HNE in the cytoplasm of hepatocytes in the HCV group indicates acute cellular rejection, which may serve as an additional immunohistochemical marker of rejection confirmation in patients with hepatitis C. Increase of acrolein in the group without rejection, regardless of etiology, in cytoplasm of blood vessel and stromal cells indicates normal graft function. The lack of NRF2 presence in initial and indicative biopsies reflects markedly reduced level of antioxidant protection in patients undergoing liver transplantation. The lack of NRF2 activation in patients diagnosed with acute cellular rejection, due to its low levels in initial biopsies, cannot be used as a possible marker of rejection, nor as a possible distinguishing factor between acute cellular rejection and recurrence of viral infection. The fact that NRF2 is markedly expressed in polymorphonuclear neutrophils and Kupffer cells in the liver is consistent with data reported in the literature. This study results support the role of oxidative stress in the pathogenesis of acute cellular rejection. Therefore, it can help in further research that will facilitate acute cellular rejection diagnosis and direct therapy in clinical practice.



## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 21. studenog 1978. godine u Rijeci. Osnovnu školu i Opću gimnaziju završila sam na Rabu.

Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci diplomirala sam 2002. i stekla stručni naziv doktor medicine. Iste godine obavila sam pripravnički liječnički staž u Kliničkom bolničkom centru u Rijeci i Domu zdravlja Rab.

2003. sam položila stručni ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva RH i stekla odobrenje Hrvatske liječničke komore za samostalni rad.

Od 2003. sam radila kao liječnik opće medicine u Službi hitne medicinske pomoći u Domu zdravlja Primorsko-goranske županije, ispostava Rab.

Specijalizaciju iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja započela sam 2005. u Kliničkoj bolnici Merkur, pod mentorstvom dr. Milice Žmire. Specijalistički ispit iz anesteziologije položila sam 2009 godine.

Sa užom specijalizacijom iz Intenzivne medicine započinjem 2012. u KB Merkur, pod mentorstvom prof.dr.sc. Ine Husedžinovića iz KB Dubrava. Ispit iz uže specijalizacije položila sam 2014.

U tijeku specijalizacije i uže specijalizacije završila sam brojne poslijediplomske tečajeve: Trajna edukacija u anesteziji (FEEA); Ultrazvukom vođena regionalna anestezija; Ljetna škola intenzivne medicine; Mehanička ventilatorna potpora; Kontinuirane tehnike bubrežnog nadomjesnog liječenja; Ultrazvuk u liječenju kritično oboljelog bolesnika (BL1 provider); Zbrinjavanje perioperacijskog krvarenja (Perioperative blood management, Heinburg, Austrija).

Od 2005. do 2015. bila sam član tima za transplantaciju solidnih organa KB Merkur.

Godine 2015. započinjem s radom u Klinici Magdalena u Krapinskim Toplicama- Klinici za kardiovaskularne bolesti Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, a od travnja 2021. sam zaposlena na Klinici za anesteziologiju, intenzivnu medicinu i liječenje boli u Kliničkom bolničkom centru Rijeka.

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu upisala sam 2012.

Autor sam i koautor više znanstvenih radova i kongresnih priopćenja, od čega su četiri izvorna znanstvena članka objavljena u CC časopisima. Aktivno prisustvujem na domaćim i međunarodnim kongresima iz područja anesteziologije i intenzivne medicine. Aktivno sudjelujem na multicentričnim istraživanjima u organizaciji Europskog anesteziološkog društva. Recenzent sam u međunarodnim časopisima, a 2015. uvrštena sam u bibliografiju Marquis Who's Who in the World.

Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog društva za anesteziologiju i intenzivno liječenje i Europskog udruženja anesteziologa (European Society of Anaesthesiology).

## 12. POPIS PUBLIKACIJA

### IZVORNI ZNANSTVENI RADOVI- Current contents (CC):

1. Brusich KT, Acan I, Filipcic NV, Gustin D. Anaesthesia for renal transplant surgery. Eur J Anaesthesiol. 2013; 30(11): 715-6.
2. Pavičić Šarić J, Vidjak V, Tomulić K, Zenko J. Effects of Age on Minimum Effective Volume of Local Anesthetic for Ultrasound-Guided Supraclavicular Brachial Plexus Block. Acta Anaesthesiol Scand 2013; 57:761-766.
3. Maksimovic B, Neretljak I, Vidas Z, Vojtusek IK, Tomulic K, Knotek M. Treatment of bleeding after kidney biopsy with recombinant activated factor VII. Blood Coagul Fibrinolysis. 2012; 23(3): 241-3.
4. Pavičić Šarić J, Mikulandra S, Guštin D, Matasić H, Tomulić K, Pavičić Dokoza K. Spinal anesthesia at the L2-3 and L3-4 levels: comparison of analgesia and hemodynamic response. Coll. Antropol 2012; 36: 151 – 156.

### IZVORNI ZNANSTVENI RADOVI- ostali časopisi:

1. Sakan S, Povšić Čevra Z, Juranko V, Tomulić Brusich K, Novkoski M, Prajdić Predrijevac D, Baudoin Z, Predrievac M, Škopljanac-Maćina A, Korda ZA, Bašić.Jukić N. Kvaliteta života u bolesnika nakon kardijalnih zahvata- pregledni rad. Acta Med Croat 2018, 72:503-508
2. Sakan S, Povšić-Čevra Z, Tomulić Brusich K, Juranko V, Prajdić-Predrijevac D, Novkoski M, Baudoin Z. A single center retrospective study of cardiac surgery associated acute kidney injury- incidence and outcomes. Acta Med Croat 2017, 71:285-291
3. Tomulic Brusich K, Acan I, Viskovic Filipcic N, Milosevic M. Influence of Diabetes Mellitus on Ultrasound-Guided Supraclavicular Nerve Block Duration: A Retrospective Observational Study. J J Anest Res 2016; 3(1):022
4. Tomulić Brusich K, Acan I, Višković Filipčić N. Ventilator-Associated Pneumonia: Comparing Cadaveric Liver Transplant and Non-Transplant Surgical Patients. Acta Clin Croat 2016; 55(3):360-369. [doi.org/10.20471/acc.2016.55.03.03](https://doi.org/10.20471/acc.2016.55.03.03)
5. Brusich KT, Acan I, Filipcic NV (2016) Oral Prednisone Increased Quality of Analgesia after Single-Shot Supraclavicular Nerve Block. Analg Resusc: Curr Res 5:1. doi:10.4172/2324-903X.1000138

6. Tomulic Brusich K, Acan I, Viskovic Filipcic N. Hydroxyethyl Starch- Friend or Foe? *British Journal of Medicine and Medical Research*, 2016 11(5): 1-12.
7. Brusich KT, Acan I, Filipcic NV, Jadrijevic S. Total peritonectomy procedure with hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy administration: single-centre case series analysis and literature review. *OA Case Reports* 2014; 3(2): 15.
8. Brusich KT, Acan I, Filipcic NV. Sepsis- induced refractory status epilepticus: a case report. *Analg Resusc: Curr Res* 2014, 3:2.
9. Tomulic K, Saric JP, Kocman B, Skrtic A, Filipcic NV, Acan I. Successful management of unsuspected retroperitoneal paraganglioma via the use of combined epidural and general anesthesia: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2013; 7: 58.
10. Brusich KT, Acan I, Filipcic NV, Gustin D. Liver transplantation: An adventure for the anaesthesiologist. *OA Anaesthetics* 2013; 1(2):
11. Pavičić Šarić J, Tomulić K, Acan I, Guštin D, Matasić H, Bogdanović Dvorščak M, Erceg G. Transport životno ugroženog bolesnika, prikazi slučajeva. *AAC* 8 (1) 1 - 5 2011.
12. Tomulić K. Rizici od zaraznih bolesti u turističkim područjima, *Infektološki glasnik* 2004; 24(1): 29-33.
13. Tomulić K.. Zarazne bolesti otoka Raba kao turističke destinacije, *Infektološki glasnik* 2002; 22(4):163-169.
14. Staraj T, Tomulić K, Škrapa-Prpić I, Sepčić J. Multipla skleroza združena sa siringomijelijom. *Acta Fac med Flum* 2002; 27(1-2): 9-13.

#### **PUBLICIRANI SAŽECI S MEĐUNARODNIH KONGRESA- CC ČASOPISI:**

1. Povšić Čevra Z, Baudoin Z, Juranko V, Novkoski M, Prajdić Predrijevac, Tomulić Brusich K, Šimunić Forić A, Klarić V. Predictors of end-stage renal disease after cardiac surgery. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 33(2019) S152-S153. DOI: 10.1053/j.jvca.2019.07.031
2. Povšić-Čevra Z, Baudoin Z, Tomulić Brusich K, Novkoski M, Juranko V, Bradić N. Incidence and predictors of acute kidney injury after open repair of abdominal aortic aneurism. *Journal of Cardiothoracis and Vascular Anesthesia*; 2018; 32(Suppl 1): S86-S87. DOI: 10.1053/j.jvca.2018.08.159
3. Povšić-Čevra Z, Jurako V, Baudoin Z, Novkoski M, Predrijevac-Prajdić D, Tomulić Brusich K, Sakan S. Octogenarians – A growing population in cardiac surgery. *Journal of Cardiovascular and Vascular Anesthesia*, 2017, 31:S34-S69. DOI: 10.1053/j.jvca.2017.02.138
4. Kovacic Vicic V, Pavicic Saric J, Tomulic Brusich K, Viskovic Filipcic N, Madjarac V. Efficacy of endotracheal intubation of pregnant women during Caesarean section -own experience: 4AP10-6. *Eur J Anaesthesiol* 2015; 32: 149.

5. Tomulic Brusich K, Acan I, Viskovic Filipcic N, Milosevic M. Duration of ultrasound-guided supraclavicular nerve block in diabetic patients. Reg Anesth Pain Med 2014; 39(5) Suppl 1: E-324.
6. Tomulic Brusich K, Acan I, Viskovic Filipcic N, Vondra Sedlacek J. Incidence and clinical outcome of ventilator-associated pneumonia among transplanted patients: 12AP1-8. Eur J Anaesthesiol. 2013; 30():183-183.
7. Tomulic K, Acan I, Viskovic Filipcic N. Levosimendan in management of critical care patients after orthotopic liver transplantation: 12AP3-3. Eur J Anaesthesiol. 2012; 29(): 180-181.
8. Bogdanović Dvorščak M, Pavičić Šarić J, Tomulić K, Adanić M. Influence of anesthetic volume on Comfort score during Ultrasound Guided Supraclavicular Brachial Plexus Block. Reg Anesth Pain Med 2012; 37(7): E-284.
9. Tomulic K, Pavicic SJ, Acan I. Effect of age on anaesthetic volume for ultrasound guided supraclavicular brachial plexus block. Eur J Anaesthesiol 2011; 28 (Suppl. 48): 113.

#### **KONGRESNA PRIOPĆENJA:**

1. Tomulić Brusich K, Povšić Čevra Z, Novkoski M, Juranko V, Prajdić Predrijevac D, Baudoin Z, Čuljak Aleksić M, Škopljanac-Maćina A. Prediktori transfuzijskog liječenja u elektivnoj kirurgiji abdominalne aorte. XVII Simpozij intenzivne medicine, Zagreb, Hrvatska, prosinac 2018
2. Povšić Čevra Z, Juranko V, Baudoin Z, Novkoski M, Prajdić Predrijevac D, Tomulić Brusich K. Octogenarian- growing population in cardiac surgery. Europsko-američka anesteziološka konferencija, Zadar, Hrvatska, lipanj 2016.
3. Sakan S, Novkoski M, Juranko V, Prajdić Predrijevac D, Povšić Čevra Z, Baudoin Z, Tomulić Brusich K, Zovko D. Neurološke komplikacije kardijalne kirurgije. XL Simpozij intenzivne medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Prosinac 2016, Zagreb, Hrvatska
4. Tomulić Brusich K, Novkoski M, Sakan S, Čuljak Aleksić M, Zovko D, Juranko V, Škopljanac Maćina A. Optimalizacija transfuzijskog liječenja u kirurgiji abdominalne aorte. XL Simpozij intenzivne medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Prosinac 2016, Zagreb, Hrvatska
5. Povšić Čevra Z, Juranko V, Baudoin Z, Novkoski M, Prajdić Predrijevac D, Tomulić Brusich K. Octogenarian- growing population in cardiac surgery. Europsko-američka anesteziološka konferencija, Lipanj 2016, Zadar, Hrvatska

6. Tomulić Brusich K, Acan I, Kovačić Vicić V, Višković Filipčić N. Supraclavicular nerve block: does kidney transplantation make a difference? *Period biol.* 2015; 117(2): 331.
7. Bogdanović Dvorščak M, Guštin D, Erceg G, Tomulić K, Acan I, Paklar N, Pavičić Šarić J, Lončar Čakalo D. Prikaz slučaja - liječenje anafilaktičkog šoka, „can' t intubate, can't ventilate“ situacije i teškog ARDS-a kod bolesnice sa simultanom transplantacijom gušterače i bubrega.
8. Pavičić Šarić J, Tomulić K, Acan I, Guštin D, Matasić H, Bogdanović Dvorščak M, Erceg G. Transport životno ugroženog bolesnika - prikazi slučajeva. *AAC* 8 (1) 1-5 2011.

### **OPSEŽNE KLINIČKE STUDIJE S VELIKIM BROJEM KOAUTORA:**

1. van Zaane B, van Klei WA, Buhre WF, Bauer P, Boerma EC, Hoeft A, Metnitz P, Moreno RP, Pearse R, Pelosi P, Sander M, Vallet B, Pettilä V, Vincent JL, Rhodes A; European Surgical Outcomes Study (EuSOS) group for the Trials groups of the European Society of Intensive Care Medicine and the European Society of Anaesthesiology. Nonelective surgery at night and in-hospital mortality: Prospective observational data from the European Surgical Outcomes Study. *Eur J Anaesthesiol.* 2015; 32(7): 477-85.
2. Pearse RM, Moreno RP, Bauer P, Pelosi P, Metnitz P, Spies C, Vallet B, Vincent JL, Hoeft A, Rhodes A; European Surgical Outcomes Study (EuSOS) group for the Trials groups of the European Society of Intensive Care Medicine and the European Society of Anaesthesiology. Mortality after surgery in Europe: a 7 day cohort study. *Lancet* 2012; 380: 1059 - 1065.

### **POGLAVLJE U KNJIZI:**

Katarina Tomulić Brusich and Ivana Acan (July 25th 2018). Anesthetic Considerations in Transplant Recipients for Nontransplant Surgery, Organ Donation and Transplantation Georgios Tsoulfas, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.74329. Available from: <https://www.intechopen.com/books/organ-donation-and-transplantation-current-status-and-future-challenges/anesthetic-considerations-in-transplant-recipients-for-nontransplant-surgery>