

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Ostojić

**Povezanost polimorfizma gena za
kemokine CXCL9 i CXCL10 s pojavom
akutnog odbacivanja jetrenoga
presatka**

DISERTACIJA



Zagreb, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ana Ostojić

**Povezanost polimorfizma gena za
kemokine CXCL9 i CXCL10 s pojavom
akutnog odbacivanja jetrenoga
presatka**

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Zavodu za gastroenterologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Merkur i Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelji rada:

doc. dr. sc. **Anna Mrzljak**, dr. med., specijalist internist – supspecijalist gastroenterologije i hepatologije

doc. dr. sc. **Tomislav Kelava**, dr. med.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim mentorima, doc. dr. sc. Anni Mrzljak i doc. dr. sc. Tomislavu Kelavi na poticaju za izradu disertacije, uvijek dostupnoj pomoći te konstruktivnim kritikama i savjetima.

Velika hvala Antoniu Markotiću, dr. med., na poduci i pomoći oko genske analize uzoraka.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za gastroenterologiju Kliničke bolnice Merkur kao i djelatnicima Zavoda za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pomoći u izradi disertacije.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji: mami, Ivi, Miji, a najviše suprugu Zvonimiru na neizmjernoj podršci.

Sadržaj

Popis oznaka i kratica.....	III
Popis slika.....	V
Popis tablica.....	VI
1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Alkoholna bolest jetre.....	1
1.1.1. Alkoholna bolest jetre i hepatocelularni karcinom.....	3
1.1.2. Alkoholna bolest jetre i transplantacija jetre.....	4
1.2. Akutno stanično odbacivanje nakon transplantacije jetre – klinički značaj.....	5
1.3. Mehanizam nastanka akutnog staničnog odbacivanja.....	7
1.4. Imunosupresivna terapija nakon transplantacije jetre.....	9
1.4.1. Kortikosteroidi.....	9
1.4.2. Kalcijneurinski inhibitori.....	10
1.4.3. Mikofenolat mofetil.....	11
1.5. Rizikni čimbenici za nastanak akutnog staničnog odbacivanja.....	12
1.6. Dijagnostika akutnog staničnog odbacivanja.....	13
1.6.1. Biopsija presatka.....	14
1.6.2. Marker iz krvi.....	16
1.6.3. Marker iz žuči i ascitesa.....	18
1.6.4. Slikovne metode.....	19
1.7. Liječenje akutnog staničnog odbacivanja.....	20
1.8. Kemokini.....	21
1.8.1. Kemokini i transplantacija solidnih organa.....	22
1.9. Kemokini CXCL9 i CXCL10.....	23
1.9.1. CXCL9/10 i transplantacija bubrega, srca i pluća.....	23
1.9.2. CXCL9/10 i transplantacija jetre.....	24
1.9.3. Polimorfizmi gena za CXCL9 i CXCL10.....	25
2. HIPOTEZA.....	26
3. CILJEVI.....	27
4. ISPITANICI I METODE.....	28
4.1. Ispitanici.....	28
4.1.1. Imunosupresija.....	28
4.2. Metode.....	29
4.2.1. Akutno stanično odbacivanje.....	31

4.2.2. Genotipizacija.....	31
4.3. Statistička analiza.....	35
5. REZULTATI	37
5.1. Opće karakteristike bolesnika i davatelja	37
5.2. Učestalost akutnog staničnog odbacivanja nakon transplantacije jetre	38
5.3. Karakteristike bolesnika ASO i ne-ASO skupine	40
5.4. Učestalost genotipova za polimorfizme CXCL9 (rs10336) i CXCL10 (rs3921)	42
5.5. Povezanost polimorfizma CXCL9 (rs10336) s akutnim staničnim odbacivanjem	43
5.6. Povezanost polimorfizma CXCL10 (rs3921) s akutnim staničnim odbacivanjem	45
5.7. Povezanost polimorfizama CXCL9 i CXCL10 s brzinom razvoja akutnog staničnog odbacivanja	47
5.8. Povezanost polimorfizama CXCL9 i CXCL10 sa stupnjem težine akutnog staničnog odbacivanja	48
5.9. Povezanost polimorfizama CXCL9 i CXCL10 s brojem epizoda akutnog staničnog odbacivanja	49
6. RASPRAVA	50
7. ZAKLJUČAK	58
8. SAŽETAK	58
9. SUMMARY	60
10. POPIS LITERATURE	61
11. ŽIVOTOPIS	75

Popis oznaka i kratica

ABJ	alkoholna bolest jetre
ALT	alanin aminotransferaza
ASO	akutno stanično odbacivanje
AST	aspartat aminotransferaza
BCLC	<i>Barcelona-Clínic Liver Cancer</i>
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
CNI	kalcijneurinski inhibitor (engl. <i>calcineurin inhibitor</i>)
CV-IPV	<i>coefficient of variability intra-patient variability</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
CXCL9	<i>C-X-C motif chemokine ligand 9</i>
CXCR3	<i>C-X-C motif chemokine receptor 3</i>
CyA	ciklosporin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECOG	<i>the Eastern Cooperative Oncology Group</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKBP12	<i>FK-binding protein 12</i>
GGT	gama-glutamilttransferaza
HCC	hepatocelularni karcinom (engl. <i>hepatocellular carcinoma</i>)
HLA	humani leukocitni antigen (engl. <i>human leukocyte antigens</i>)
HR	omjer rizika (engl. <i>hazard ratio</i>)
IFN- γ	interferon- γ (engl. <i>interferon gamma</i>)
IL	interleukin (engl. <i>interleukin</i>)
INR	<i>international normalized ratio</i>
IP10	<i>IFN-γ-inducible protein 10</i>
IQR	interkvartilni raspon (engl. <i>interquartile range</i>)
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MELD	<i>Model For End-Stage Liver Disease</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIG	<i>monokine induced by IFN-γ</i>

MMF	mikofenolat mofetil
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NFQ	hvatač fluorescencije (engl. <i>nonfluorescent quencher</i>)
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
RAI	indeks aktivnosti odbacivanja (engl. <i>rejection activity index</i>)
RARHA	<i>EU Joint Action on Reducing Alcohol Related Harm</i>
SD	standardna devijacija
SNP	polimorfizam pojedinih nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
Tac	takrolimus
TCMR	<i>T cell mediated rejection</i>
TGF- β	transformirajući faktor rasta beta (engl. <i>transforming growth factor beta</i>)
TJ	transplantacija jetre
TNF- α	tumor nekrotizirajući faktor- α (engl. <i>tumour necrosis factor alpha</i>)
UNOS	<i>the United Network for Organ Sharing</i>

Popis slika

Slika 1. Shematski prikaz akutnog odbacivanja. Direktni i indirektni put prepoznavanja aloantigena..	9
Slika 2. Uloga CXCL9 i CXCL10 u procesu akutnog staničnog odbacivanja	23
Slika 3. Shematski prikaz dizajna istraživanja	30
Slika 4. Alelno razlikovni graf za genotipizaciju polimorfizma CXCL9 (rs10336).	33
Slika 5. Alelno razlikovni graf za genotipizaciju polimorfizma CXCL10 (rs3921).	34
Slika 6. Učestalost ASO-a u ispitivanoj kohorti	38
Slika 7. Broj epizoda ASO-a u skupini bolesnika s ASO	38
Slika 8. Zastupljenost pojedinih stupnjeva ASO-a prema RAI-indeksu.....	39
Slika 9. Raspodjela CXCL9 i CXCL10 genotipa u ukupnoj populaciji bolesnika	42
Slika 10. Prikaz broja bolesnika koji su imali više od jedne epizode ASO-a ovisno o genotipu za CXCL9 i CXCL10.....	49

Popis tablica

Tablica 1. RAI (engl. <i>rejection acitivity index</i>).....	15
Tablica 2. Karakteristike primatelja i davatelja prilikom transplantacije jetre.....	37
Tablica 3. Karakteristike ASO i ne-ASO skupine.....	41
Tablica 4. Učestalost alela za CXCL9 (rs10336) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini.....	43
Tablica 5. Učestalost genotipova za CXCL9 (rs10336) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini	44
Tablica 6. Učestalost alela polimorfizma CXCL10 (rs3921) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini.....	45
Tablica 7. Učestalost genotipova za CXCL10 (rs3921) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini	46
Tablica 8. Povezanost polimorfizama za CXCL9/10 s brzinom razvoja ASO-a	47
Tablica 9. Povezanost polimorfizama CXCL9 i CXCL10 s indeksom aktivnosti odbacivanja -RAI.....	48

1. UVOD I SVRHA RADA

Transplantacija jetre još je uvijek najuspješnija metoda liječenja bolesnika s ireverzibilnim akutnim ili kroničnim zatajenjem jetre. U zadnjih 30 godina ostvareno je značajno poboljšanje preživljenja kako presatka tako i primatelja nakon transplantacije jetre, prvenstveno zahvaljujući razvitku kirurških tehnika i unapređenju imunosupresivnih protokola. Uvođenje kalcijneurinskih inhibitora, ciklosporina i takrolimusa značajno je smanjilo stopu akutnog staničnog odbacivanja i uvelike poboljšalo jednogodišnje preživljenje primatelja jetre (1, 2).

Odbacivanje presatka imunološka je reakcija na prisutnost stranog organa koja može dovesti do disfunkcije i zatajenja presatka (3). Za dijagnozu i klasifikaciju odbacivanja presatka nužna je njegova biopsija, a ovisno o histopatološkoj slici odbacivanje jetrenog presatka dijeli se na tri osnovna tipa: akutno stanično odbacivanje (ASO), kronično odbacivanje i odbacivanje posredovano protutijelima (3).

1.1. Alkoholna bolest jetre

Nedavni veliki napreci u liječenju virusnog hepatitisa B i C visoko učinkovitim antiviralnim lijekovima doprinijeli su diljem svijeta smanjenju udjela bolesnika s uznapredovalom bolesti jetre u podlozi virusnih hepatitisa (4). Posljedično, sve veća pozornost pridaje se alkoholnoj bolesti jetre (ABJ) i nealkoholnoj bolesti jetre, koje su postale najčešće bolesti jetre (5). Dok nealkoholna bolest jetre uobičajeno uzrokuje blagi oblik jetrene bolesti, ABJ ostaje glavni uzrok smrti povezane s jetrenom bolesti u svijetu (6). Preciznije, prema *The Global Burden of Disease* procijenjeno je da je preko 1,25 milijuna smrti u 2016. godini posljedica bolesti jetre (2,3% globalnog prosjeka), od kojih su njih 60% do 80% posljedica ABJ-a (7, 8). Zemljopisna su područja u kojima više od polovine stanovništva konzumira alkohol Europa (osobito istočna Europa i Rusija), Australija i Sjeverna Amerika (9). U Republici Hrvatskoj provedeno je istraživanje na 1.500 ispitanika u sklopu europskog istraživanja o alkoholu (engl. *EU Joint Action on Reducing Alcohol Related Harm, RARHA*) prema kojem 78,1% ispitanika izjavilo da konzumira alkohol, odnosno 85,3% ukupno ispitanih muškaraca i 71,0% ukupno ispitanih žena (10).

Alkoholna bolest jetre uključuje spektar različitih jetrenih bolesti: steatozu jetre, steatohepatitis, fibrozu jetre, cirozu i hepatocelularni karcinom (HCC) (11). Dijagnoza ABJ-a postavlja se na temelju podatka o konzumaciji alkohola >20 g/dan u žena i >30 g/dan u muškaraca uz prisutnost kliničkih i/ili bioloških abnormalnosti koje upućuju na jetreno oštećenje (12). Velik udio bolesnika s histološkim značajkama ABJ-a nema nikakve kliničke simptome ni znakove bolesti kao ni laboratorijske abnormalnosti, zbog čega bi asimptomatski bolesnici s prekomjernom konzumacijom alkohola trebali biti uvršteni u programe probira (aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), gama-glutamilttransferaza (GGT) i tranzijentna elastografija) (12).

U 10% do 35% kroničnih alkoholičara dolazi do progresije jetrene bolesti iz steatoze u steatohepatitis, fibrozu jetre te, konačno, cirozu i hepatocelularni karcinom (11). S druge strane, važno je istaknuti da postoje jasni dokazi da prestanak konzumacije alkohola u bilo kojem stadiju bolesti smanjuje rizik za progresiju i smanjuje učestalost komplikacija ciroze jetre (13).

Bolesnici s alkoholnom cirozom mogu biti asimptomatski u kompenziranoj fazi bolesti ili se prezentiraju neopstruktivnom žuticom, ascitesom, varicealnim krvarenjem, hepatalnom encefalopatijom i/ili bakterijskom infekcijom, primjerice spontanom bakterijskim peritonitisom u dekompenziranoj fazi bolesti. Prognoza bolesnika s alkoholnom cirozom vrlo je loša s petogodišnjim mortalitetom od 71% te se procijenjuje uz pomoć dvaju sljedećih bodovnih sustava: MELD-a (engl. *Model For End-Stage Liver Disease*) i Child-Pugha (14).

Bodovni sustav MELD iskazuje se kao brojčana vrijednost u rasponu od 6 do 40, a izračunava se iz formule koja uključuje vrijednost kreatinina, ukupnog bilirubina i INR-a (engl. *international normalized ratio*) bolesnika (15). Što je vrijednost MELD-a viša, to je viši i tromjesečni mortalitet bolesnika. UNOS (engl. *the United Network for Organ Sharing*) i Eurotransplant koriste MELD za prioritizaciju bolesnika na listi čekanja za transplantaciju jetre. Child-Pugh bodovni sustav izračunava se na temelju pet obilježja koja označavaju bolest jetre: ukupni bilirubin, serumski albumin, INR, ascites i hepatalna encefalopatija (16). Svako od tih obilježja boduje se od 1 do 3, pri čemu 3 boda označavaju najviši stupanj poremećaja. Osim toga, ovisno o broju bodova Child-Pugh bodovni sustav dijeli se u tri klase. Prema tome, u Child-Pugh klasu A ubrajaju se bolesnici s bodovima od 5 do 6 te njihovo jednogodišnje

preživljenje iznosi 100%, bolesnici s brojem bodova od 7 do 9 svrstavaju se u klasu B s jednogodišnjem preživljenjem od 80%, dok bolesnici s brojem bodova od 10 do 15 čine Child-Pugh klasu C s najlošijim jednogodišnjim preživljenjem od 45% (16).

1.1.1. Alkoholna bolest jetre i hepatocelularni karcinom

Primarni maligni tumor jetre peti je najčešći tumor u svijetu i drugi najčešći uzrok smrti povezan s tumorom, s 854.000 novih slučajeva i 810.000 slučajeva smrti godišnje (17). Hepatocelularni karcinom čini 90% svih primarnih tumora jetre, a s obzirom na to da je njegova incidencija kontinuirano u porastu, predstavlja velik javnozdrastveni problem diljem svijeta (18).

Bolesnici s alkoholnom cirozom imaju značajno povišen rizik za razvoj HCC-a, dok s druge strane dugotrajni prestanak konzumiranja alkohola smanjuje rizik za HCC za 6% do 7% po godini (19). Prema rezultatima programa probira za HCC tijekom pet godina kod 450 bolesnika s alkoholnom cirozom Child-Pugh A i B godišnja incidencija iznosila je 2,6% (20). U nedavno objavljenoj francusko-belgijskoj prospektivnoj CIRRAL-studiji na 650 bolesnika s biopsijom dokazanom alkoholnom cirozom Child-Pugh A koji su bili ultrazvučno praćeni u sklopu probira na HCC godišnja incidencija iznosila je 2,9% (21). U istoj studiji velik postotak HCC-a dijagnosticiran je u fazi kada ga je moguće uspješno aktivno liječiti, što ističe važnost probira u toj skupini bolesnika (21).

Utjecaj alkoholne bolesti jetre na kliničku prezentaciju, liječenje i ishod HCC-a bio je uspoređivan s kroničnim hepatitisom C kao etiološkim čimbenikom ciroze jetre i HCC-a. Kohortu je činilo 1.642 bolesnika s kroničnim hepatitisom C i HCC-om te 573 bolesnika s alkoholnom bolesti jetre i HCC-om, pri čemu je dijagnoza HCC-a u podlozi ABJ-a češće bila dijagnosticirana izvan programa probira. Nadalje, ta skupina bolesnika imala je teže oštećenje jetrene funkcije, a tumorske lezije bile su veće, češće multifokalne s prisutnom invazijom vene porte. U navedenoj studiji ukupno preživljenje bolesnika s ABJ-om i HCC-om bilo je statistički značajno manje u odnosu na bolesnike s HCC-om i kroničnim hepatitisom C (27,4 mjeseca vs 36 mjeseci; $p=0,021$) (22).

Prognoza i liječenje bolesnika s alkoholnom cirozom jetre i hepatocelularnim karcinomom ovisi o stadiju bolesti prema BCLC-ovoj (engl. *Barcelona-Clínic Liver Cancer*)

klasifikaciji. Klasifikacija BCLC ima pet stadija koji se definiraju prema funkciji jetre odnosno Child-Pugh klasifikaciji, statusu tumora (broj i veličina lezija, makrovaskularna invazija, ekstrahepatalna diseminacija) i kliničkom stanju bolesnika definiranom prema klasifikaciji ECOG (engl. *the Eastern Cooperative Oncology Group*). Moguće su opcije liječenja kirurška resekcija, transplantacija jetre, lokoregionalna terapija i sistemska terapija (18).

Trenutačno svaki treći bolesnik na listi čekanja za transplantaciju jetre u Europi ima cirozu jetre i hepatocelularni karcinom. Upravo je stoga hepatocelularni karcinom danas jedna od najbrže rastućih indikacija za transplantaciju jetre (23). Petogodišnje preživljenje nakon transplantacije jetre zbog hepatocelularnog karcinoma koji zadovoljava Milanske kriterije (jedan tumor ≤ 5 cm ili ≤ 3 tumora s promjerom lezija ≤ 3 cm i bez vaskularne invazije) iznosi od 65% do 80% (24).

Prema američkom transplantacijskom registru od 2002. do 2016. godine od ukupno 24.431 bolesnika na listi čekanja za transplantaciju jetre pod dijagnozom hepatocelularnog karcinoma i poznate etiologije jetrene bolesti njih 2.520 (10,3%) imalo je ABJ, dok je njih 1.936 imalo ABJ i kronični hepatitis B i/ili C. U istom je periodu prevalencija hepatocelularnog karcinoma među bolesnicima na listi čekanja za transplantaciju jetre porasla za 3,1 puta ako su u podlozi imali ABJ odnosno 6,4 puta ako su imali ABJ i kronični virusni hepatitis (25).

1.1.2. Alkoholna bolest jetre i transplantacija jetre

Transplantacija jetre (TJ) najučinkovitija je terapijska mjera za bolesnike s uznapredovalom parenhimskom bolesti jetre s jednogodišnjim preživljenjem presatka i primatelja od 80% do 85% (26). Preživljenje kako presatka tako i primatelja nakon transplantacije jetre zbog alkoholne bolesti jetre slično je kao kod bolesnika transplantiranih zbog drugih etiologija (27). Broj transplantacija jetre zbog ABJ-a porastao je zadnjih nekoliko godina, iako tek manjina bolesnika s ABJ-om zadovoljava kriterije za transplantaciju. U Sjedinjenim Američkim Državama broj registriranih bolesnika na listi čekanja za transplantaciju jetre pod dijagnozom alkoholne bolesti jetre porastao je za 45% u periodu od 2004. do 2013. godine, dok je u Europi udio bolesnika podvrgnutih transplantaciji jetre zbog ABJ-a porastao za 8,3% između 1988.-1995. i 1996.-2000. godine (28, 29).

Iako je alkoholna bolest jetre postala jedna od najčešćih indikacija za transplantaciju jetre u Europi i Sjedinjenim Američkim Državama, još uvijek je jedna od najkontroverznijih tema u hepatologiji. Ponajprije je tako zbog mišljenja javnosti i eksperata pojedinih medicinskih djelatnosti da su bolesnici s alkoholnom bolesti jetre sami odgovorni za svoju bolest te da negativno utječu na društvo u cjelini (30).

Bolesnici s alkoholnom bolesti jetre u fazi ciroze i MELD-a ≥ 15 kandidati su za liječenje transplantacijom. Većina transplantacijskih programa primjenjuje pravilo o apstinenciji u trajanju od šest mjeseci prije obrade bolesnika za postupak transplantacije jetre. Šestomjesečna apstinencija prihvaćeni je period jer omogućuje bolesniku da se oporavi od akutnog učinka alkohola na jetru i izbjegne potrebu za transplantacijom, no isto tako postala je *surogat* za predikciju bolesnika koji će nastaviti apstinirati i nakon transplantacije jetre (31).

Danas se u Kliničkoj bolnici Merkur, iz koje su regrutirani svi bolesnici predmetnog istraživanja, obavlja preko 90% transplantacija jetre u Republici Hrvatskoj, odnosno između 115 i 120 transplantacija jetre godišnje. Gotovo sve presadbe jetre obavljaju se s umrlom davatelja, a alkoholna bolest jetre najčešća je indikacija za transplantaciju jetre u Kliničkoj bolnici Merkur.

1.2. Akutno stanično odbacivanje nakon transplantacije jetre – klinički značaj

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 (32). Budući da je aktivacija T-limfocita identificirana kao ključni patogenetski čimbenik u nastanku akutnog odbacivanja jetre, u zadnje se vrijeme sve više predlaže uporaba termina "odbacivanje posredovano T-stanicama" (engl. *T cell mediated rejection*, TCMR) umjesto akutnog staničnog odbacivanja (33).

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 TJ-a (2, 34). Prema vremenu nastanka odbacivanja ASO se dijeli na rani i kasni, pri čemu se rani definira kao epizoda ASO-a u prvih šest mjeseci nakon transplantacije jetre i najvjerojatnije je posljedica direktne prezentacije aloantigena (33). Ako se ASO dijagnosticira šest mjeseci

nakon transplantacije jetre, klasificira se kao kasni i vjerojatno ovisi o indirektnoj prezentaciji aloantigena (33).

Zbrinjavanje bolesnika nakon transplantacije solidnih organa usredotočeno je na sprečavanje akutnog odbacivanja s obzirom na to da je to klinički značajan događaj koji ugrožava preživljenje i presatka i primatelja. Izuzetak od te paradigme bila je transplantacija jetre jer su rezultati prije 2000. godine upućivali na to da akutno odbacivanje nakon transplantacije jetre nije povezano s disfunkcijom presatka i/ili smrti primatelja (35-37). Međutim, nedavno objavljeno istraživanje provedeno na 45.423 primatelja jetre utvrdilo je da je biopsijom dokazan ASO u 15,6% ispitanika klinički vrlo važan događaj i kod transplantacije jetre. Prema toj studij ASO značajno povećava rizik za zatajenje presatka (omjer rizika, engl. *hazard ratio*, HR 4,41, 95% engl. *confidence interval*, CI 3,71-5,23) i smrtnost primatelja (HR 3,94, 95% CI, 3,22-4,83) (32). Ti se rezultati, između ostalog, mogu objasniti činjenicom da su prethodni rezultati bazirani na istraživanjima s malim brojem ispitanika te da su svim ispitanicima učinjene protokolarne biopsije na temelju kojih je bolesnicima bez kliničkih i/ili laboratorijskih znakova odbacivanja postavljena dijagnoza ASO-a. Međutim, s obzirom na činjenicu da limfocitna infiltracija može označavati početak razvoja imunotolerancije, ne preporuča se liječiti odbacivanje ako je postavljeno samo na temelju biopsije. Upravo zbog toga protokolarne biopsije danas više nisu rutina u većini transplantacijskih centara (38). Osim toga, primatelji jetre u toj kohorti bili su stariji i bolesniji u trenutku transplantacije jetre te su imali više pridruženih bolesti, što funkciju presatka čini osjetljivijom na ASO. Naposljetku, vodeći se prethodnim rezultatima istraživanja prema kojima ASO ne utječe negativno na preživljenje presatka i primatelja, moguće je da epizode ASO-a nisu bile dovoljno agresivno praćene niti liječene, što je moglo doprinijeti kroničnoj ozljedi presatka (39, 40).

Nakon transplantacije jetre bolesnici moraju doživotno uzimati imunosupresivne lijekove kako bi se spriječilo odbacivanje presatka. Kako je prethodno navedeno, uvođenje kalcijneurinskih inhibitora (engl. *calcineurin inhibitors*, CNI), ciklosporina (CyA) početkom 1980-ih i takrolimusa (Tac) 1990-ih godina dovelo je do značajnog smanjenja stope ASO-a i značajno se poboljšalo jednogodišnje preživljenje bolesnika (1, 2).

Unatoč navedenim prednostima imunosupresivne terapije njihove nuspojave rezultiraju značajnim morbiditetom i povećanim mortalitetom primatelja jetre. Infekcije, *de novo* malignomi i kardiovaskularne bolesti danas su vodeći uzroci smrti primatelja jetre koji nisu povezani s transplantacijom *per se*, već su posljedice dugotrajne izloženosti imunosupresivnoj terapiji (41, 42). Uz to, CNI kod jedne trećine primatelja jetre dovode do kronične bolesti bubrega, koja može progredirati do terminalnog stadija bolesti s posljedičnim bubrežnim nadomjesnim liječenjem ili transplantacijom bubrega (43, 44).

S obzirom na navedeno, redukcija i doze i vremena uzimanja imunosupresivne terapije bez rizika za razvoj ASO-a danas je važan cilj u transplantacijskoj medicini. Upravo za takav cilj nužno je identificirati set specifičnih molekula i medijatora, odnosno biomarkera čiji bi ekspresijski profil omogućio praćenje imunološkog statusa i individualizaciju imunosupresivnog protokola. Na tome tragu osobito su zanimljivi genetski biomarkeri koji su stabilni i moguće ih je odrediti prije transplantacije organa.

Identifikacija povezanosti polimorfizama pojedinih nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisam*, SNP) i akutnog staničnog odbacivanja osnovni je korak u otkrivanju takvog genetskog biomarkera.

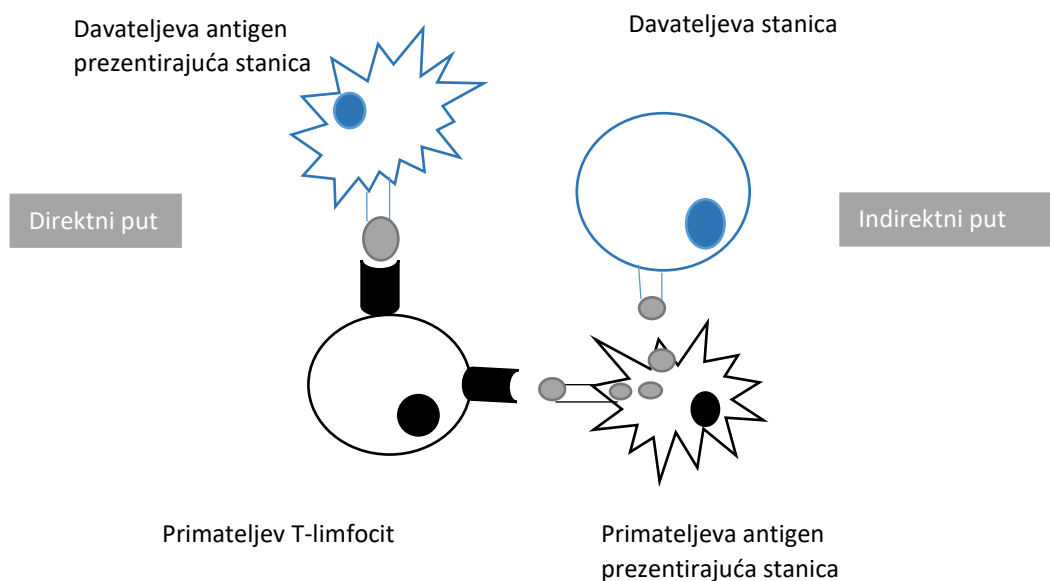
1.3. Mehanizam nastanka akutnog staničnog odbacivanja

Akutno stanično odbacivanje započinje tako što primateljevi T-limfociti prepoznaju donorske antigene. Ključni sustav antigena koji izaziva jaku imunoreakciju protiv presatka (alografta) jest glavni sustav antigena tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) koji se u ljudi naziva HLA (engl. *human leukocyte antigens*). Sustav se dijeli u tri skupine, pri čemu su skupine I i II važnije jer određuju molekule koje imaju ključnu ulogu u preradbi i predočavanju antigena. Antigeni skupine MHC-I nalaze se na svim stanicama s jezgrom i trombocitima, a antigeni skupine MHC-II na predočnim stanicama uključujući B-limfocite, dendritičke stanice, makrofage i Langerhansove stanice. Kada se presadak od primatelja razlikuje u antigenima skupine MHC-I i MHC-II, aktiviraju se primateljevi limfociti CD4+ i CD8+. Pritom limfociti CD4+ bivaju aktivirani aloantigenima MHC-II koje nose predočne stanice što se nalaze u presatku, a limfociti CD8+ aloantigenima MHC-I koji se se nalaze na svim stanicama presatka (45).

T-Limfociti mogu prepoznati aloantigene MHC izravno (direktno) ili neizravno (indirektno), odnosno nakon preradbe u vlastitim predočnim stanicama (Slika 1.) (45). Kod izravnog prepoznavanja aloreaktivni efektorski T-limfociti vežu se izravno na nepodudarne aloantigene MHC. Da bi uzrokovali reakciju, pomagački T-limfociti moraju dobiti aktivacijski signal putem predočne stanice davatelja koja nosi aloantigene MHC-II (s davateljevim ili primateljevim prerađenim peptidima). S obzirom na navedeno, aloreaktivnost posebice se pojačava ako presadak tkiva nosi u sebi predočne stanice davateljskog podrijetla, koje se nazivaju suputničkim leukocitima. Ovaj tip odbacivanja uključuje davateljeve predočne stanice koje iz presatka putuju u regionalne limfne čvorove, gdje podražuju limfocite CD4+. Ti se limfociti aktiviraju, luče citokine i potiču limfocite CD8+. Nadalje, aktivirani aloreaktivni limfociti CD8+ putuju u presadak i ubrzano ga uništavaju. Ti citotoksični T-limfociti izravno liziraju endotelne i parenhimske stanice presatka jer prepoznaju davateljeve antigene MHC-I. Neizravno prepoznavanje aloantigena pri odbacivanju presatka označava da su davateljevi antigeni prerađeni u primateljevim predočnim stanicama i predočeni T-limfocitima pomoću primateljevih molekula MHC. Aktivirani aloreaktivni T-limfociti primatelja luče citokine i aktiviraju druge stanice imunskog sustava. Nedavno je predložen treći tip prepoznavanja, odnosno semidirektno prepoznavanje u kojem aloantigeni ulaze u primateljeve predočne stanice i neprerađeni se prezentiraju na površini stanice (46, 47).

Međutim, unatoč svijesti o dvama osnovnim putevima prepoznavanja njihova je važnost u svakodnevnoj kliničkoj praksi limitirana (48). U reakciji na aloantigene sudjeluju brojni citokini utječući na aktivaciju, diferencijaciju i funkciju T-limfocita. Među najvažnijima su interleukin 2 (IL-2) koji aktivira CD8+ te interferon- γ (IFN- γ) koji pojačava izražaj molekula MHC, potiče djelovanje predočnih stanica i limfocita te zajedno s tumor nekrotizirajućim faktorom- α (TNF- α) aktivira makrofage (48).

Posebnu ulogu među citokinima imaju kemokini odgovorni za migraciju upalnih stanica na mjesto imunološkog odgovora. Oni se dijele u četiri skupine, a jednu od njih čine CXC kemokini u koje spadaju CXCL9 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 9*) i CXCL10 (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*). Navedeni kemokini dominantno su produkti predočnih stanica te se vežu na receptor CXCR3 (engl. *C-X-C motif chemokine receptor 3*, CXCR3) izražen na T-limfocitima. Aktivacijom receptora CXCR3 dolazi do regrutacije efektorskih T-limfocita u alograft koji imaju ključnu ulogu u staničnom odbacivanju presatka (45).



Slika 1. Shematski prikaz akutnog odbacivanja. Direktni i indirektni put prepoznavanja aloantigena.

1.4. Imunosupresivna terapija nakon transplantacije jetre

Imunosupresivna terapija nakon transplantacije jetre može se podijeliti u dvije faze: fazu indukcije i fazu održavanja. Indukcijska faza terapije obično se sastoji od kortikosteroida s kojima se započinje odmah nakon transplantacije i primjenjuju se intravenski tijekom nekoliko dana, a potom se nastavlja s oralnim oblicima steroida (49). U indukciji se mogu koristiti i drugi lijekovi, poput protutijela na receptor IL-2 ili antitimocitnog globulina, koji se obično primjenjuju kada je potrebno odgoditi uvođenje kalcijneurinskih inhibitora (engl. *calcineurin inhibitors*, CNI), primjerice u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti ili ako postoji povišeni imunološki rizik (retransplantacija zbog odbacivanja, simultana transplantacija jetre i bubrega, visoko senzitivni bolesnici). Kalcijneurinski inhibitori glavna su sastavnica terapije održavanja, pri čemu takrolimus ima prednost pred ciklosporinom. Antiproliferativni lijekovi, poput mikofenolat mofetila (MMF), azatioprina ili inhibitora mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*), koriste se kako bi se smanjila toksičnost CNI-ja ili kod bolesnika s višim rizikom odbacivanja presatka (50).

1.4.1. Kortikosteroidi

Glukokortikosteroidi suprimiraju vezanje protutijela i komplementa, povećavaju ekspresiju IL-10 te smanjuju sintezu IL-2, IL-6 i IFN- γ u T-stanicama (51-53). U

transplantacijskoj medicini koriste se sljedeće četiri formulacije kortikosteroida: hidrokortizon, prednizon, prednizolon i metilprednizolon. Obično se započinje sa 1 g metilprednizolna u bolusu za vrijeme anhepatalne faze tijekom operacije te se nastavlja s metilprednizolonom 20 mg/dan intravenski. Kada bolesnik počne tolerirati peroralne lijekove, nastavlja se s prednizonom 20 mg/dan čija se doza postupno smanjuje do izostavljanja iz terapije tijekom tri do šest mjeseci. Značajne su nuspojave kortikosteroidne terapije šećerna bolest, arterijska hipertenzija, hiperlipidemija, usporeno cijeljenje rane, podložnost infekcijama te osteopenija (54).

1.4.2. Kalcijneurinski inhibitori

Ciklosporin i takrolimus vežu se za citoplazmatske proteine (ciklosporin za ciklofilin, takrolimus za FK506-vežući protein 12 (engl. *FK-binding protein 12*, FKBP12) i na taj način inhibiraju funkciju kalcijneurina koji ima serin/treonin fosfataznu aktivnost. Inhibicijom kalcijneurina sprečava se transkripcija gena za citokine, osobito IL-2, te aktivacija T-limfocita koji imaju ključnu ulogu u odbacivanju (50).

Ciklosporin se može dati intravenski, no obično se primjenjuje oralno kao tableta ili oralna suspenzija. Vršne koncentracije u krvi postižu se od dva do četiri sata od uzimanja lijeka te se lijek široko distribuira, s najvišim koncentracijama u masnom tkivu, gušterači, nadbubrežnim žlijezdama, bubrezima i jetri. Prosječno poluvrijeme života jest 15 sati, no može biti od 10 do 40 sati. Ciklosporin se metabolizira u jetri putem citokroma P4503A4 i potom izlučuje u žuč. Standardna početna doza jest od 5 do 7 mg/kg dva puta dnevno. Potom se doza titrira prema preporučenoj ciljnoj serumskoj koncentraciji CyA, odnosno od 150 do 200 ng/mL u prva tri mjeseca. Nakon toga doza se postupno smanjuje uz ciljnu vrijednost CyA od 80 to 120 ng/mL od trećeg do dvanaestog mjeseca i od 50 do 70 ng/ml nakon godinu dana od transplantacije jetre (50).

Takrolimus inhibira proizvodnju IL-2 i IFN- γ 100 puta snažnije od ciklosporina i ima izvrsnu bioraspoloživost, što ga čini glavnim CNI-jem u većini imunosupresivnih protokola nakon transplantacije jetre (55). Superiornost takrolimusa nad ciklosporinom potvrđena je u metaanalizi 16 randomiziranih kliničkih studija u kojima je takrolimus bio superiorniji kada se analiziralo preživljenje primatelja i presatka, akutno stanično odbacivanje i steroidrezistentno odbacivanje (56, 57). Obično se započinje s niskim dozama takrolimusa, od 0,5 do

1 mg svakih 12 sati prvog dana nakon transplantacije jetre, i postupno se povećava do ciljne serumske koncentracije od 8 do 10 ng/mL koja se održava tijekom prva tri mjeseca. Od trećeg mjeseca do godinu dana nakon transplantacije jetre ciljna koncentracija takrolimusa jest od 6 do 8 ng/ml, a nakon godinu dana oko 5 ng/ml (50).

U studiji s 493 primatelja jetre koji su uzimali takrolimus kao primarni lijek u imunosupresivnom protokolu oni bolesnici koji su imali najniže koncentracije lijeka (prema engl. *trough levels*) > 7 ng/ml u vrijeme protokolarne biopsije (srednja vrijednost šest dana nakon transplantacije) imali su značajno manju stopu srednje teškog i teškog odbacivanja u usporedbi s onim bolesnicima koji su imali niže razine Tac koncentracije (24% vs 41%) (58). Uz to, bolesnici koji su imali srednju vrijednost takrolimusa između 7 i 10 ng/ml u 15 dana od transplantacije jetre imali su manju stopu gubitka presatka tijekom praćenja u odnosu na bolesnike koji su imali najniže koncentracije (prema engl. *trough levels*) < 7 ng/ml (relativni rizik, RR 2,32) ili 10–15 ng/ml (RR 2,17). Ti rezultati upućuju na to da su u ranom poslijetransplantacijskom periodu ciljne vrijednosti takrolimusa između 7 i 10 ng/ml povezane s boljim kliničkim ishodima nakon transplantacije jetre.

Iako su ciklosporin i takrolimus vrlo učinkoviti u prevenciji odbacivanja, oba lijeka imaju značajne nuspojave, primjerice nefrotoksičnost, arterijsku hipertenziju i šećernu bolest (59).

1.4.3. Mikofenolat mofetil

Mikofenolat mofetil jest 2-morfolinoetil ester mikofenolne kiseline. Mikofenolna kiselina jak je, selektivan, nekompetitivni i reverzibilan inhibitor inozin monofosfat dehidrogenaze te inhibira put *de novo* sinteze gvanozin nukleotida bez ugradnje u DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*). Budući da su T- i B-limfociti izuzetno ovisni o *de novo* sintezi purina u svojoj proliferaciji, a druge vrste stanica mogu iskoristiti pomoćne puteve, citostatski učinci MPA izraženiji su na limfocitima nego na drugim stanicama. MMF ne uzrokuje neurotoksičnost i nefrotoksičnost te se učestalo koristi uz CNI i kortikosteroide kako bi se smanjila njihova toksičnost. Uobičajena doza iznosi 1 g dva puta dnevno. Najčešće su nuspojave supresija koštane srži, bol u trbuhu, mučnina i povraćanje. Međutim, te nuspojave ovisne su o dozi i obično se povuku nakon sniženja doze MMF-a ili isključenja MMF-a iz terapije (49).

1.5. Rizični čimbenici za nastanak akutnog staničnog odbacivanja

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 (35). 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 (60). Nadalje, poznato je da Afroamerikanci imaju značajno viši rizik za ASO (61, 62).

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 (2, 60, 61, 63, 64). Dodatno, bolesnici koji su podvrgnuti retransplantaciji vjerojatnije će imati ASO (60). Dobro je poznato da je pozitivna T-stanična križna reakcija, koja se javlja u oko 7% primatelja jetre, povezana s povećanim rizikom za razvoj ASO-a i smanjenim petogodišnjim preživljenjem (64-68).

Tijekom 2017. i 2018. godine objavljeno je nekoliko istraživanja koja su ispitivala rizične čimbenike za ASO. Dogan i suradnici prvi su put pokazali da ispitanici koji razviju bilijarne komplikacije (anastomotske i neanastomotske) nakon transplantacije jetre imaju pet puta veći rizik za ASO (OR 4.89) u odnosu na ispitanike bez bilijarnih komplikacija. U istom istraživanju identificirana su još dva rizična čimbenika za ASO: nepodudarnost između spola davatelja i primatelja (preciznije, nepodudarnost sa ženskim donorom) povećava rizik za ASO (OR 3.0) kao i citomegalovirusna nepodudarnost (OR 9.88; donor negativni serološki status, primatelj pozitivan serološki status) (69). Nadalje, Del Bello i suradnici ispitivali su povezanost varijabilnosti serumske vrijednosti takrolimusa i ASO-a jetrenog presatka te su utvrdili da su vrijednost Tac <5 ng/mL uz Tac CV-IPV (engl. *coefficient of variability intra-patient variability*)

> 35% (OR 4.83) i > 45% (OR 9.73) nezavisni čimbenici rizika za razvoj biopsijom dokazanog ASO-a (70).

Najčešće je istraživana povezanost ASO-a s polimorfizmima gena za citokine s obzirom na to da su oni glavni modulatori imunološke reakcije. Primjerice, Yu i suradnici utvrdili su povezanost ASO-a nakon transplantacije jetre s polimorfizmom gena za faktore regulacije ekspresije interferon regulatornog faktora 5 rs3757385, pri čemu su zaključili da su G/G homozigoti bili pod većim rizikom za akutno stanično odbacivanje (71). Također je ustanovljena značajna povezanost ASO-a s polimorfizmom gena za transformirajući faktor rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF-β) +869, no u istom istraživanju nije utvrđena takva povezanost za TNF-α G-308A i IL 10 G-1082 (72, 73).

Suprotno tomu, određena istraživanja pronašla su značajnu povezanost između TNF-α i IL 10 s ASO-om, zbog čega su rezultati inkonkluzivni (74-76). Nadalje, za pojedine polimorfizme gena nije ustanovljena povezanosti s ASO-om. Neki su od njih supkategorije proteina TNF-obitelji – Fas(CD95) i FasL(CD178), kao i geni za CD40, za antigen citotoksičnih T-limfocita 4 i za protein programirane stanične smrti 1 (77-79).

U nastojanju da se odredi uniformna definicija kliničke sumnje na ASO Rodríguez-Perálvarez M. 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 μmol/L, povišene vrijednosti eozinofila u krvi >0,4x10⁹ u prvih 10 dana od transplantacije jetre i >0,1x10⁹ 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 (80).

1.6. Dijagnostika akutnog staničnog odbacivanja

Bolesnik s ASO-om može biti asimptomatski ili imati kliničke simptome i znakove poput febriliteta, blage boli u abdomenu, umora i/ili opće slabosti, koji su u poslijetransplantacijskom periodu nespecifični (35).

U svakodnevnoj kliničkoj praksi dijagnostički algoritam započinje sumnjom na ASO kod bolesnika s povišenim vrijednostima aminotransferaza (AST, ALT) i enzima kolestaze (alkalna fosfataza, GGT) te hiperbilirubinemijom koje se kliničkim razlučivanjem ne mogu drugačije

objasniti. Te biokemijske abnormalnosti također su nespecifične, ne reflektiraju težinu ASO-a te zahtijevaju isključenje drugih uzroka disfunkcije presatka poput vaskularne patologije (tromboza arterije hepatike, tromboza vene porte i/ili donje šuplje vene), bolesti bilijarnog trakta (striktura, kolangitis, intrahepatalna kolestaza), sepse, oštećenja jetre uzrokovanog lijekovima i citomegalovirusne infekcije, prije nego se postavi klinička sumnja na ASO (35).

1.6.1. Biopsija presatka

Današnji je zlatni standard za dijagnosticiranje ASO-a perkutana biopsija presatka. U prošlosti su neki transplantacijski centri provodili protokolarne 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 (35, 40, 81). Stoga su protokolarne biopsije napuštene te se danas samo bolesnici s kliničkom sumnjom na ASO podvrgavaju biopsiji presatka.

Biopsija presatka invazivna je dijagnostička metoda čije su najčešće komplikacije bol i krvarenje, a uvijek se mora uzeti u obzir i mogućnost neadekvatnog uzorkovanja tkiva. S obzirom na navedeno rizični čimbenici povezani s ASO-om te neinvazivne dijagnostičke metode s visokom senzitivnošću i specifičnošću za ASO bili bi vrlo korisni u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Tijekom 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća bili su u uporabi različiti histološki kriteriji za dijagnozu i klasifikaciju ASO-a poput kriterija Pittsburgh, Minnesota, Europskih kriterija i the Royal Free Hospital kriterija. Međutim, 1997. godine svi su navedeni kriteriji zamijenjeni Banff kriterijima koji se koriste i danas (82).

Tipičnu histološku sliku kod ASO-a čini trijada sastavljena od miješane upalne infiltracije portalnih prostora (dominatno mali i veliki limfociti, potom eozinofili, makrofazi, plazma-stanice i ponekad neutrofili), oštećenja žučnih kanala i endotelitisa. Prisutnost barem dviju navedenih komponenti potrebna je kako bi se mogla postaviti dijagnoza ASO-a (82). Težina odbacivanja gradira se prema RAI-indeksu (engl. *rejection activity index*) o čemu ovisi i tip liječenja. RAI-indeks 1-2 označava neodređeni ASO, 3-4 blagi ASO, 5-6 srednje teški ASO dok 7-9 odgovara teškom ASO-u (Tablica 1.). Histološke karakteristike kasnog ASO-a gotovo su jednake ranom ASO-u, no obično je prisutan manji broj aktiviranih limfocita uz manje

izraženo oštećenje žučnih kanala, te endotelitis nižeg stupnja, dok je izraženija lobularna upalna aktivnost (33).

Tablica 1. RAI (engl. *rejection activity index*). Preuzeto i modificirano prema Banff schema for grading liver allograft rejection. *Hepatology*. 1997; 25: 658-663.

RAI		
KATEGORIJA	KRITERIJ	BOD
UPALA PORTALNOG PROSTORA	infiltrat limfocita u manjinskom broju trijada	1
	miješani infiltrat limfocita s pokojim blastom, neutrofilima i eozinofilima u većini trijada	2
	miješani infiltrat sastavljen od limfocita i brojnih blasta, neutrofila i eozinofila sa širenjem u periportalni parenhim	3
UPALA ŽUČNIH VODOVA	manji je broj vodova infiltriran upalnim stanicama te pokazuje blage reaktivne promjene poput povećanih jezgara: citoplazma omjera epitelnih stanica	1
	većina vodova ili svi vodovi prožeti su upalnim stanicama; određen stupanj vodova pokazuje degenerativne promjene poput nuklearnog pleomorfizma, poremećaj polarizacije i citoplazmatsku vakuolizaciju epitela	2
	većina vodova ili svi vodovi prožeti su upalnim stanicama; većina vodova ili svi vodovi pokazuju degenerativne promjene poput nuklearnog pleomorfizma, poremećaj polarizacije i citoplazmatsku vakuolizaciju epitela	3
UPALA VENSKOG EPITELA	manji broj portalnih i/ili hepatskih venula infiltrirana je limfocitima	1
	većina portalnih i/ili hepatskih venula ili sve infiltrirane su limfocitima	2
	većina portalnih i/ili hepatskih venula ili sve infiltrirane su limfocitima; upala se proširuje na perivenularno područje i povezana je s perivenularnom nekrozom hepatocita	3
Napomena: ukupni je broj bodova zbroj bodova svih kategorija		

1.6.2. Markeri iz krvi

Jetreni enzimi

Dijagnoza ASO-a obično se postavlja na temelju porasta jetrenih enzima nakon transplantacije jetre. Međutim, nekoliko istraživanja pokazalo je da povišeni standardni jetreni enzimi imaju nisku senzitivnost i nisku specifičnost za ASO te da slabo koreliraju sa stupnjem težine histopatološkog nalaza (83-85). Uz to, povišeni jetreni enzimi ne omogućuju diferencijaciju od ostalih poslijetransplantacijskih komplikacija. Rodríguez-Perálvarez i suradnici pokazali su da bolesnici sa srednje teškim i teškim ASO-om imaju više vrijednosti bilirubina i kolestatskih parametara, niže vrijednosti AST-a i niži AST/ALT omjer u odnosu na bolesnike s blagim ASO-om ili bez ASO-a. Međutim, kombinacija tih parametara u logističkoj regresijskoj analizi imala je senzitivnost od 73% i specifičnost od 52,9% (86).

Eozinofili

Prisutnost eozinofila u presatku nezavisan je čimbenik povezan s ASO-om jetrenog presatka. Barnes i suradnici utvrdili su da odsutnost periferne eozinofilije može predvidjeti odsutnost srednje teškog/teškog ASO-a, no ne može se koristiti za predviđanje ili procjenu odgovora na kortikosteroidnu terapiju (87). U istraživanju provedenom na 690 primatelja jetre koji su bili podvrgnuti protokolarnim biopsijama pokazalo se da je periferna eozinofilija značajno povezana sa srednje teškim i teškim ASO-om (OR=2,15; p=0,007), no površina ispod ROC-krivulje bila je 0,58. Isti istraživači utvrdili su da je delta broj eozinofila između biopsija učinjenih prije i poslije liječenja ASO-a bio jedini nezavisni prediktor histološkog poboljšanja (OR=3,12; p=0,001) (86).

U istraživanju Rodríguez-Perálvarez M. i suradnika koje je ispitalo rizične čimbenike na temelju kojih se može definirati uniformna klinička sumnja na ASO utvrđeni su sljedeći nezavisni rizični čimbenici za ASO: povišene vrijednosti bilirubina na dan biopsije (OR=5,83; p<0,001), rastuće vrijednosti bilirubina četvrtog dana prije biopsije presatka (OR=4,57; p=0,003) te povišene apsolutne vrijednosti eozinofila (OR=3,81; p=0,004). Optimalna granica za povišene apsolutne vrijednosti eozinofila bila je $>0,1 \times 10^9$. Kombinacijom tih rizičnih čimbenika površina ispod ROC-krivulje za predviđanje srednje teškog i teškog ASO-a iznosila je 0,81 (80).

Žučne kiseline

Poznato je da postoji međusobna povezanost između žučnih kiselina i imunološkog sustava pri čemu žučne kiseline mogu mijenjati koncentraciju citotoksičnih T-limfocita i IL-2 te mogu utjecati na HLA-ekspresiju u jetri (88). ASO je karakteriziran povišenjem koncentracije glikodeoksikolne i deoksikolne kiseline u serumu te značajnim smanjenjem omjera kolne/deoksikolne kiseline (89). Jassen i suradnici istraživali su dijagnostičku vrijednost svakodnevnog serijskog mjerenja vrijednosti žučnih kiselina u serumu u poslijetransplantacijskom periodu kod 41 bolesnika nakon transplantacije jetre. Kod 22 bolesnika s histološki dokazanim ASO-om utvrđene su tri puta veće koncentracije ukupnih žučnih kiselina u odnosu na početnu vrijednost (vrijednost prvog dana nakon transplantacije jetre) te je izračunata senzitivnost od 86% i specifičnost od 100% za ASO (90). Muraca i suradnici također su utvrdili tri puta veće serumske vrijednosti žučnih kiselina kod bolesnika s ASO-om, no isti su porast utvrdili i kod bolesnika s trombozom arterije hepatike i septičkim šokom (91).

Citokini

Idealan biomarker za dijagnozu ASO-a te praćenje imunološkog statusa trebao bi imati sljedeća obilježja: biti visoko senzitivan i specifičan, neinvazivan te brzo dostupan (92). U tu su svrhu najčešće ispitivani biomarkeri proinflamatorni i imunoregulatorni citokini čija je ekspresija povećana za vrijeme ASO-a. Boleslawski i suradnici ispitivali su razinu intracelularnog IL-2 u CD3+CD8+ stanicama kod 21 primatelja jetre prije i šest mjeseci nakon transplantacije jetre te su utvrdili da je intracelularna ekspresija IL-2 u CD8+ T-stanicama usko povezana s razvojem ASO-a (93). Te rezultate poslije su potvrdili Akoglu i suradnici koji su pokazali da bolesnici koji su imali ASO imaju statistički značajno više razine IL-2 u CD8+ T-stanicama u odnosu na bolesnike koji nisu imali epizodu ASO-a. Također, utvrdili su dobru korelaciju između udjela CD8+IL-2+ stanica i stupnja težine ASO-a prema Banff kriterijima (Spearman's rho= 0,81; P= 0,027) (94).

Nadalje, Millan i suradnici evaluirali su intracelularnu ekspresiju i sekreciju IFN- γ i IL-2 u 47 bolesnika s transplantiranom jetrom. Prijetransplantacijska granična vrijednost od 55,8% CD8+IFN- γ + detektirala je bolesnike s visokim rizikom za razvoj ASO-a sa senzitivnosti od 75% i specifičnosti od 82%. U prvom tjednu nakon transplantacije jetre bolesnici kod kojih

je postotak inhibicije IFN- γ , CD8+IFN- γ + i Cd8+IL2+ bio manji od 40% razvili su ASO, što ukazuje na nisku osjetljivost na imunosupresivnu terapiju (95).

Vrijednosti TNF- α ispitivane su u plazmi 50 bolesnika nakon transplantacije jetre te su njihove koncentracije TNF- α bile značajno više u bolesnika s ASO-om (941 ± 83 pg/ml vs 240 ± 6 pg/ml, $p = 0,0001$) (96). Kita i suradnici analizirali su serumske vrijednosti IL-6 kod 20 bolesnika nakon transplantacije jetre koji nisu imali infekciju i pokazali su da su razine citokina značajno više od nula do četiri dana prije histološke dijagnoze ASO-a u odnosu na bolesnike koji nisu imali histološki dokazan ASO (131 ± 78 pg/ml vs 40 ± 21 pg/ml, $p < 0,01$). U istom radu nisu našli korelaciju između povišenja IL-6 i RAI-a, no zaključili su da se povišene vrijednosti IL-6 zbog ASO-a mogu razlikovati od povišenja IL-6 zbog infekcije s obzirom na to da su tada vrijednosti više od 1.000 pg/mL (97).

Uloga IL-9, IL-23 i IL-27 u području transplantacije jetre još mora biti razjašnjena. Serumske vrijednosti IL-9 bile su određivane u 50 bolesnika prvog i sedmog dana nakon transplantacije jetre te na dan biopsije, no nije nađena razlika kod bolesnika s ASO-om u odnosu na bolesnike bez ASO-a (98). Slični rezultati dobiveni su i za serumske koncentracije IL-17 i IL-23 u ranom poslijetransplantacijskom periodu (99).

Danas postoje dva dijagnostička testa bazirana na određivanju biomarkera koja je odobrila FDA (engl. *Food and Drug Administration*) u području transplantacijske medicine. Jedan test procijenjuje funkciju imunoloških stanica na temelju određivanja koncentracije adenoza trifosfata u cirkulirajućim CD4 stanicama (ImmuKnow[®]), a drugi se test temelji na određivanju ekspresije gena (AlloMap[®]) i služi za predviđanje odsutnosti akutnog odbacivanja nakon transplantacije srca (100).

1.6.3. Markeri iz žuči i ascitesa

Budući da ASO uzrokuje značajne upalne promjene žučnih kanalića, istraživani su markeri iz žuči koji bi se mogli koristiti u diferencijalnoj dijagnozi ASO-a. Međutim, uzorkovanje žuči nije praktično, osobito danas, kada većina transplantacijskih centara ne koristi rutinski T-kateter u perioperativnom periodu. Uzorkovanje žuči u odsutnosti T-katetera zahtijevalo bi endoskopsku kanulaciju žučnih vodova, što je invazivna metoda s ozbiljnim komplikacijama. Do sada su ispitivane vrijednosti IL-6 u žuči te su u istraživanju koje je

uključivalo 51 bolesnika utvrđene nekoliko puta povišene vrijednosti IL-6 za vrijeme ASO-a i smanjenje na početne vrijednosti nakon primjene terapije protiv odbacivanja presatka (101).

U prospektivnoj studiji na 45 bolesnika kod kojih je učinjena transplantacija jetre utvrđene su statistički značajno povišene vrijednosti IL-8 ($11,62 \pm 4,25$ pg/ml, $p < 0,001$) u žuči kod bolesnika s ASO-om u odnosu na bolesnike koji su imali infektivne komplikacije ili nisu imali komplikacije u poslijetransplantacijskom periodu (102). Kim i suradnici utvrdili su statistički značajno povišenu enzimatsku aktivnost alanin aminopeptidaze N (APN/CD13) u uzorku žuči sakupljenom tri dana prije biopsije jetre kod bolesnika s histološki dokazanim ASO-om u odnosu na bolesnike bez ASO-a ($p=0,004$) (103).

U istraživanju provedenom na 30 djece nakon transplantacije jetre ispitivane su vrijednosti citokina u ascitesu. Tijekom prva dva tjedna od transplantacije jetre nije utvrđeno značajno povišenje vrijednosti receptora IL-2 i IL-6 ni u serumu ni u ascitesu između bolesnika koji su imali ASO i onih bez ASO-a. Međutim, koncentracija antagonista na receptor IL-1 bila je značajno povišena 48 h prije ASO-a (ASO vs ne-ASO; $p=0,01$) (104).

Unatoč dobrim rezultatima korištenje markera iz žuči i ascitesa, zapravo, kontroverzno je s obzirom na to da su za njihovo uzorkovanje, kako je već istaknuto, potrebni invazivni postupci s potencijalno ozbiljnim komplikacijama.

1.6.4. Slikovne metode

Doppler

Doppler jetre neinvanzivna je metoda koja se redovito koristi za evaluaciju vaskularnih komplikacija u ranom i kasnom poslijetransplantacijskom praćenju bolesnika nakon transplantacije jetre. S obzirom na to da je ASO upalni proces koji zahvaća parenhim presatka uključujući i vaskularne strukture, očekivano je to da se mijenja i hemodinamika presatka, koja se može detektirati Dopplerom jetre.

Do sada je objavljeno nekoliko radova koji su pokazali da je Doppler koristan u dijagnozi ASO-a. Harms i suradnici utvrdili su pad u damping-indeksu portalne vene i porast damping-indeksa hepatalnih vena kod bolesnika s ASO-om (105). Bolognesi i suradnici pokazali su da je ASO povezan sa značajnim padom brzine protoka u portalnoj veni te porastom indeksa pulzatilnosti u spleničnoj arteriji (106). S druge strane, postoji nekoliko

istraživanja koja nisu našla povezanost Dopplera s ASO-om te za sada nema dovoljno dokaza da bi se Doppler mogao koristiti u dijagnosticiranju ASO-a (107, 108).

Elastografija

Tranzijentna elastografija neinvazivna je metoda koja koristi ultrazvučne i elastične valove niskih frekvencija u procjeni fibroze jetre. Budući da je ASO difuzni upalni proces, može se očekivati da mijenja elastografska svojstva jetrenog presatka. Crespo i suradnici u istraživanju provedenom na 27 ispitanika s biopsijom dokazanim ASO-om pokazali su da tvrdoća jetre od 8,5 kPa ima 100% pozitivnu prediktivnu vrijednost u dijagnozi srednje teškog/teškog ASO-a (109). Međutim, s obzirom na to da tranzijentna elastografija nije specifična dijagnostička metoda kojom bi se dokazala bolest, odnosno nakon transplantacije jetre ne može diferencirati bolesnike s ASO-om u odnosu na bolesnike s recidivom virusnih hepatitisa, njezina je primjena u dijagnozi ASO-a limitirana.

1.7. Liječenje akutnog staničnog odbacivanja

Liječenje ASO-a ovisi o težini odbacivanja, odnosno RAI-indeksu i odgovoru na početno liječenje.

Liječenje blagog odbacivanja (RAI 3-4) ovisi o imunosupresivnoj terapiji koju bolesnik uzima. Primjerice, ako bolesnik uzima ciklosporin, tada se ciklosporin može zamijeniti takrolimusom, a ako bolesnik uzima takrolimus i serumska je razina supertapijska, tada je potrebno povisiti dozu. Uz to se mikofenolat mofetil može dodati u terapiju ili se njegova doza može povisiti. U svim slučajevima potrebno je pažljivo pratiti serumske vrijednosti jetrenih enzima i kod bolesnika kod kojih se ne potvrdi njihova regresivna dinamika indicirano je ponoviti biopsiju presatka. Ako nije došlo do histološkog oporavka, treba započeti liječenje visokim dozama kortikosteroida (110).

Kod bolesnika sa srednje teškim i teškim ASO-om (RAI >4) optimalna su terapija visoke doze kortikosteroida. 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 inicijalnu terapiju važan je čimbenik trajanja liječenja. U randomiziranoj studiji protokol koji uključuje 1.000 mg metilprednizolona prvog dana, nakon čega slijedi snižavanje doze od 200 mg/dan do 20 mg/dan tijekom šest dana pokazao se

učinkovitijim u liječenju ASO-a i imao manje infektivnih komplikacija nego davanje 1.000 mg metilprednizolona tijekom tri uzastopna dana (111).

U više od 80% bolesnika s ASO-om koji su liječeni visokim dozama kortikosteroida dolazi do biokemijskog i histološkog oporavka u tri do pet dana po započinjanju terapije (50). Promjena u vrijednosti AST-a možda je najbolji laboratorijski pokazatelj odgovora na terapiju 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 (50).

Iako su visoke doze kortikosteroida vrlo učinkovite u liječenju ASO-a, one istovremeno povećavaju podložnost bolesnika infekcijama, uključujući oralnu kandidijazu, citomegalovirus, *Aspergillus*, *Pneumocystis jirovecii* te bakterijske infekcije. Stoga kada se ASO liječi visokim dozama kortikosteroida, preporuča se ponovno uvođenje ili produženje profilakse citomegalovirusa vanganciklovirom tijekom tri do šest mjeseci te profilaksa infekcije *Pneumocystis jirovecii* trimetoprim-sulfametoksazolom tijekom tri do šest mjeseci (110).

Kod bolesnika s povišenim jetrenim enzimima usprkos provedenom liječenju visokim dozama kortikosteroida potrebno je ponoviti biopsiju presatka. Ako i dalje postoje elementi odbacivanja presatka, postavlja se dijagnoza steroid-rezistentnog odbacivanja. Steroid-rezistentno 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 basiliximab), mikofenolat mofetil ili takrolimus (111).

1.8. Kemokini

Kemokini ili kemotaktički citokini mali su peptidi (od 8 do 10 kD) koji imaju glavnu ulogu u regrutiranju leukocita na mjesto imunološkog odgovora, aktivaciji upalnih stanica, regulaciji selektina/integrina, hematopoezi i angiogenezi (112-114). Kemokine luče predočne stanice, u prvom redu makrofagi, potom dendritičke stanice i B-limfociti, no mogu ih lučiti endotelne stanice i druge neimunostne stanice (45).

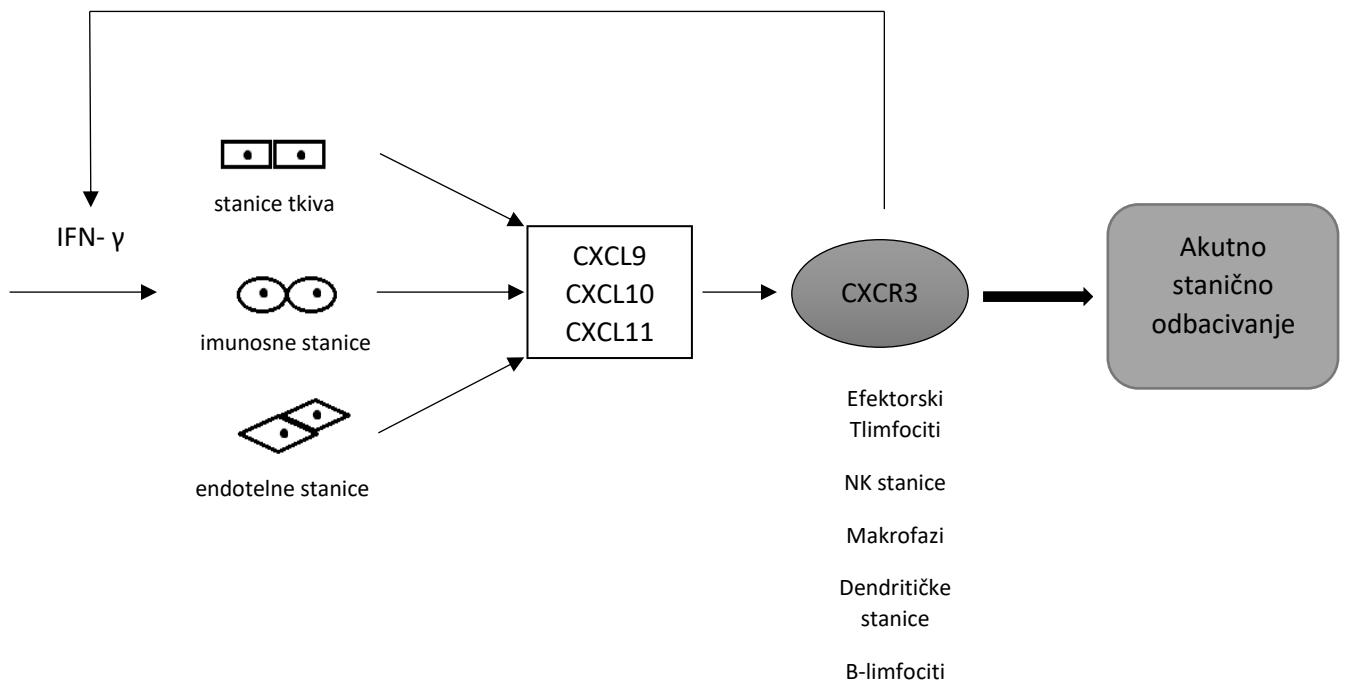
Do sada je poznato oko 50 kemokina, a prema slijedu aminokiselina nakon pojave prvog cisteina oni se dijele u četiri skupine: CXC, CC, C i CXXXC, gdje X označava bilo koju aminokiselinu između dvaju cisteina (112). Kemokini se prema funkciji mogu podijeliti u dvije

grupe: (1) homeostatički/konstitutivni kemokini, koji reguliraju limfocitnu cirkulaciju i usmjerenu migraciju limfocita i dendritičkih stanica u limfne organe te (2) upalni/inducirani kemokini, koji kontroliraju migraciju efektorskih leukocita na mjesto upale ili ozljede tkiva kao odgovor na proupalni podražaj poput lipopolisaharida i primarnih citokina, primjerice IL-1, IFN- γ , TNF- α , itd. (115-117).

Svoju funkciju kemokini ostvaruju vežući se na specifične receptore, odnosno membranske proteine koji čine transmembranske petlje sa sedam domena, a povezane su u membrani s velikim proteinima G. Do sada je poznato oko 20 podtipova kemokinskih receptora, a podijeljeni su u nekoliko skupina: CCR, CXCR, XCR1 i b te CX3CR1 (118).

1.8.1. Kemokini i transplantacija solidnih organa

Glavni događaj u akutnom staničnom odbacivanju presatka jest infiltracija presatka efektorskim T-limfocitima. U presatku efektorski T-limfociti eksprimiraju svoju funkciju tako da dovode do citolize i produkcije citokina koji su primarni posrednici oštećenja presatka. Najvažniji citokin koji stvaraju CD4+ i CD8+ T-limfociti tijekom ASO-a jest INF- γ (119, 120). Kao odgovor na INF- γ dolazi do izlučivanja INF- γ induciranih kemokina CXCL9 ili MIG (engl. *monokine induced by IFN- γ*), CXCL10 ili IP10 (engl. *IFN- γ -inducible protein 10*) i CXCL11. Geni za navedene kemokine kod ljudi nalaze se na četvrtom kromosomu. CXCL9 i CXCL10 najviše izlučuju predočne stanice, makrofazi i B-limfociti, a vezanjem na receptor CXCR3 izražen na T-limfocitima dolazi do regrutacije efektorskih T-limfocita u alograft (Slika 2.). U do sada objavljenim eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima dokazano je da kemokini CXCL9-11, uz druge čimbenike, imaju ključnu ulogu u regrutiranju T-limfocita u presadak, a time i u akutnom staničnom odbacivanju (117, 119-124).



Slika 2. Uloga CXCL9 i CXCL10 u procesu akutnog staničnog odbacivanja

1.9. Kemokini CXCL9 i CXCL10

Poseban interes za CXCR3 i CXCL9-11 u području transplantacijske medicine pojavio se nakon 2000. godine, kada su Hancock i suradnici pokazali da MHC nepodudarni srčani presadak u miša ima duže preživljenje ako se radi o mišu kojem je izbačen gen za CXCR3 (CXCR3^{-/-}). Preživljenje presatka povećalo se s osam dana kod divljeg tipa na 60 dana kod tipa CXCR3^{-/-} (125).

Daljnje kliničke studije potvrdile su korelaciju između ekspresije i razine CXCL9-11, u presatku ili u biološkim tekućinama, te akutnog odbacivanja nakon transplantacije srca, bubrega, pluća i jetre (117, 126-129).

1.9.1. CXCL9/10 i transplantacija bubrega, srca i pluća

Jackson i suradnici pokazali su da bolesnici s transplantiranim bubregom i epizodom akutnog odbacivanja presatka ili BK-infekcijom imaju značajno više koncentracije CXCL9 i CXCL10 u urinu u odnosu na transplantirane bolesnike bez navedenih komplikacija. Isti autori

utvrdili su da koncentracije CXCL9 i CXCL10 u urinu imaju bolju dijagnostičku senzitivnost i specifičnost za navedena stanja u odnosu na serumski kreatinin (130).

Multicentrična studija provedena na 280 bolesnika s transplantiranim bubregom validirala je nisku razinu CXCL9 u urinu kao optimalni neinvazivni biomarker za odbacivanje bubrežnog presatka s visokom prognostičkom snagom te stratificirala niskorizične bolesnike od visokorizičnih za oštećenje presatka (131). Nadalje, posttransplantacijski CXCL10 detektiran u stanicama urinarnog epitela predviđa akutno odbacivanje bubrežnog presatka s graničnom vrijednosti 9,11 kopija mRNA, a visoke vrijednosti CXCL10 u plazmi nakon transplantacije pluća povezane su s disfunkcijom presatka trećeg stupnja (132, 133). Također, pokazalo se da određivanje prijetransplantacijskih razina CXCL10 može predvidjeti akutno odbacivanje bubrega, odnosno da je granična vrijednost serumskog CXCL10 od 150 pg/ml senzitivna i specifična za odbacivanje presatka (134).

Slični su rezultati dobiveni i kod bolesnika nakon transplantacije srca, gdje je prijetransplantacijsko mjerenje CXCL10 imalo najvišu prediktivnu vrijednost za epizodu ranog odbacivanja tijekom dva do tri mjeseca nakon transplantacije (135). Prema tim rezultatima CXCL10 određen prije transplantacije čini se kao idealan kandidat za predviđanje akutnog odbacivanja srca i bubrega, dok se serumske vrijednosti CXCL10 poslije transplantacije srca nisu razlikovale između bolesnika s odbacivanjem i bez odbacivanja presatka (136).

1.9.2. CXCL9/10 i transplantacija jetre

Kao kod transplantacije srca, bubrega i pluća, i kod transplantacije jetre ispitivana je povezanost ASO-a s ekspresijom i koncentracijom CXCL9-11 u primatelja jetre prije i poslije transplantacije. U radu Friedmana i suradnika ustanovljene su značajno povišene serumske razine CXCL9 i CXCL10 već prvi dan poslije transplantacije jetre kod bolesnika s ASO-om (137). Nadalje, Asaoka i suradnici utvrdili su povišenu ekspresiju glasničke ribonukleinske kiseline (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) za CXCL9 u ASO-grupi u usporedbi s ne-ASO-grupom ($p=0,007$) te značajno smanjenje razine ekspresije CXCL9 mRNA nakon uspješno provedenog liječenja ($p=0,002$) (138).

U studiji Raschzoka i suradnika utvrđene su povišene serumske vrijednosti CXCL9 prije transplantacije jetre i u ranom postoperacijskom periodu kod bolesnika s histološki

dokazanim ASO-om (139). Nadalje, Kim i suradnici opisali su statistički značajno više serumske vrijednosti IL10, IL17, CXCL10 i CXCL11 u ispitanika s ASO-om u odnosu na ispitanike bez ASO-a nakon transplantacije jetre. Štoviše, prediktivna vrijednost serumske razine CXCL10 u kombinaciji s IL10, IL17 u procjeni ASO-a iznosila je 94,9% (140).

1.9.3. Polimorfizmi gena za CXCL9 i CXCL10

Unatoč utvrđenoj pozitivnoj korelaciji povišenih serumskih prijetransplantacijskih i poslijetransplantacijskih razina kemokina CXCL9-11 s ASO-om, utjecaj polimorfizama njihovih gena u odbacivanju presatka nakon transplantacije jetre, prema našim spoznajama, do sada nije istraživao.

S druge strane, polimorfizam gena za CXCL9 i CXCL10 povezan je s težinom infekcija poput virusnih hepatitisa B i C, tuberkuloze, kao i sa sljedećim autoimunim bolestima: šećernom bolesti tipa I, reumatoidnim artritisom i multiplom sklerozom (141-147). Ustanovljena je povećana učestalost polimorfizma gena za CXCL10 rs8878G u odraslih bolesnika sa šećernom bolesti tipa I i reumatoidnim artritisom (146, 148). Također se pokazalo da je CXCL10 GG genotip nezavisni faktor povezan s većom vjerojatnosti izvanzglobnih manifestacija reumatoidnog artritisa (146).

Skupina španjolskih autora proučavala je povezanost polimorfizama gena za CXCL9-11 sa stupnjem fibroze jetre u bolesnika s hepatitisom C i koinfekcijom humanim virusom imunodeficijencije. Utvrđena je povećana vjerojatnost težeg stupnja fibroze kod bolesnika zaraženih hepatitisom C genotipom 1 s CXCL9 rs10336 TT, CXCL10 rs3921 GG i CXCL11 rs4619915 AA (149).

U području transplantacijske medicine, prema našim saznanjima, utjecaj polimorfizama gena CXCL9 i CXCL10 jedino je istraživao u transplantaciji koštane srži. Nakata i suradnici ustanovili su značajno bolje petogodišnje preživljenje i nižu smrtnost povezanu s komplikacijama transplantacije koštane srži kod bolesnika s CXCL10 rs3921 CG ili GG genotipom u odnosu na bolesnike s CC genotipom (150).

2. HIPOTEZA

Hipoteza istraživanja jest da su polimorfizmi gena za kemokine CXCL9 i CXCL10 povezani s pojavom akutnog staničnog odbacivanja kod bolesnika s alkoholnom bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega nakon transplantacije jetre. Akutno stanično odbacivanje jest imunološki odgovor posredovan T-limfocitima primatelja na davateljeve glavne komplekse tkivne podudarnosti, koje klinički ugrožava kako preživljenje presatka tako i primatelja jetre.

Glavni je događaj u akutnom staničnom odbacivanju infiltracija presatka efektorskim T-limfocitima, koji eksprimiraju svoju funkciju tako da dovode do citolize i produkcije citokina, koji su primarni posrednici oštećenja presatka. Kemokini ili kemotaktički citokini mali su peptidi (od 8 do 10 kD) koji, između ostaloga, imaju glavnu ulogu u regrutiranju leukocita na mjesto imunološkog odgovora i aktivaciji upalnih stanica.

S obzirom na činjenicu da kemokini CXCL9 i CXCL10 imaju ključnu ulogu u regrutiranju T-limfocita u presadak te činjenicu da su povišene serumske vrijednosti CXCL9 i CXCL10 povezane s pojavom akutnog staničnog odbacivanja, hipoteza disertacije jest da su polimorfizmi gena za kemokine CXCL9 i CXCL10 povezani s pojavom akutnog staničnog odbacivanja.

3. CILJEVI

Primarni je cilj istraživanja analizirati povezanost između polimorfizama gena za CXCL9 i CXCL10 s akutnim staničnim odbacivanjem jetrenog presatka kod bolesnika s alkoholnom bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega nakon transplantacije jetre.

Nadalje, sekundarni su ciljevi disertacije sljedeći:

1. odrediti učestalost polimorfizama gena za kemokine CXCL9 i CXCL10 u populaciji bolesnika s transplantiranom jetrom zbog alkoholne bolesti jetre
2. odrediti učestalost akutnog staničnog odbacivanja u bolesnika nakon transplantacije jetre zbog alkoholne bolesti jetre
3. odrediti omjer izgleda za pojavu akutnog staničnog odbacivanja između bolesnika s pojedinim alelima gena za kemokine CXCL9 i CXCL10
4. odrediti postoji li povezanost stupnja težine akutnog staničnog odbacivanja prema Banff kriterijima s polimorfizmima gena za kemokine CXCL9 i CXCL10
5. odrediti postoji li povezanost između brzine razvoja akutnog staničnog odbacivanja i polimorfizama gena za kemokine CXCL9 i CXCL10
6. odrediti postoji li povezanost između broja epizoda akutnog staničnog odbacivanja i polimorfizama gena za kemokine CXCL9 i CXCL10
7. odrediti kliničke čimbenike koji doprinose akutnom staničnom odbacivanju u bolesnika s alkoholnom bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega nakon transplantacije jetre.

4. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je provedeno u obliku retrospektivne studije na skupini od 215 bolesnika s alkoholnom bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega kod kojih je izvršena transplantacija jetre u razdoblju od siječnja 2009. do lipnja 2017. godine u Kliničkoj bolnici Merkur.

Istraživanje je provedeno u suradnji Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Merkur i Zavoda za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Merkur te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz poštivanje etičkih načela i bioetičkih principa koji su u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Svim ispitanicima predstavljeno je i objašnjeno istraživanje te su imali priliku postaviti istraživaču pitanja o predmetnoj studiji.

4.1. Ispitanici

Uključni kriteriji bili su bolesnici stariji od 18 godina kod kojih je učinjena transplantacija jetre zbog alkoholne bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega. Bolesnici koji su transplantirani zbog druge etiologije jetrene bolesti, bolesnici s multiorganskim transplantacijama kao i prethodnim transplantacijama solidnih organa isključeni su iz ovog istraživanja.

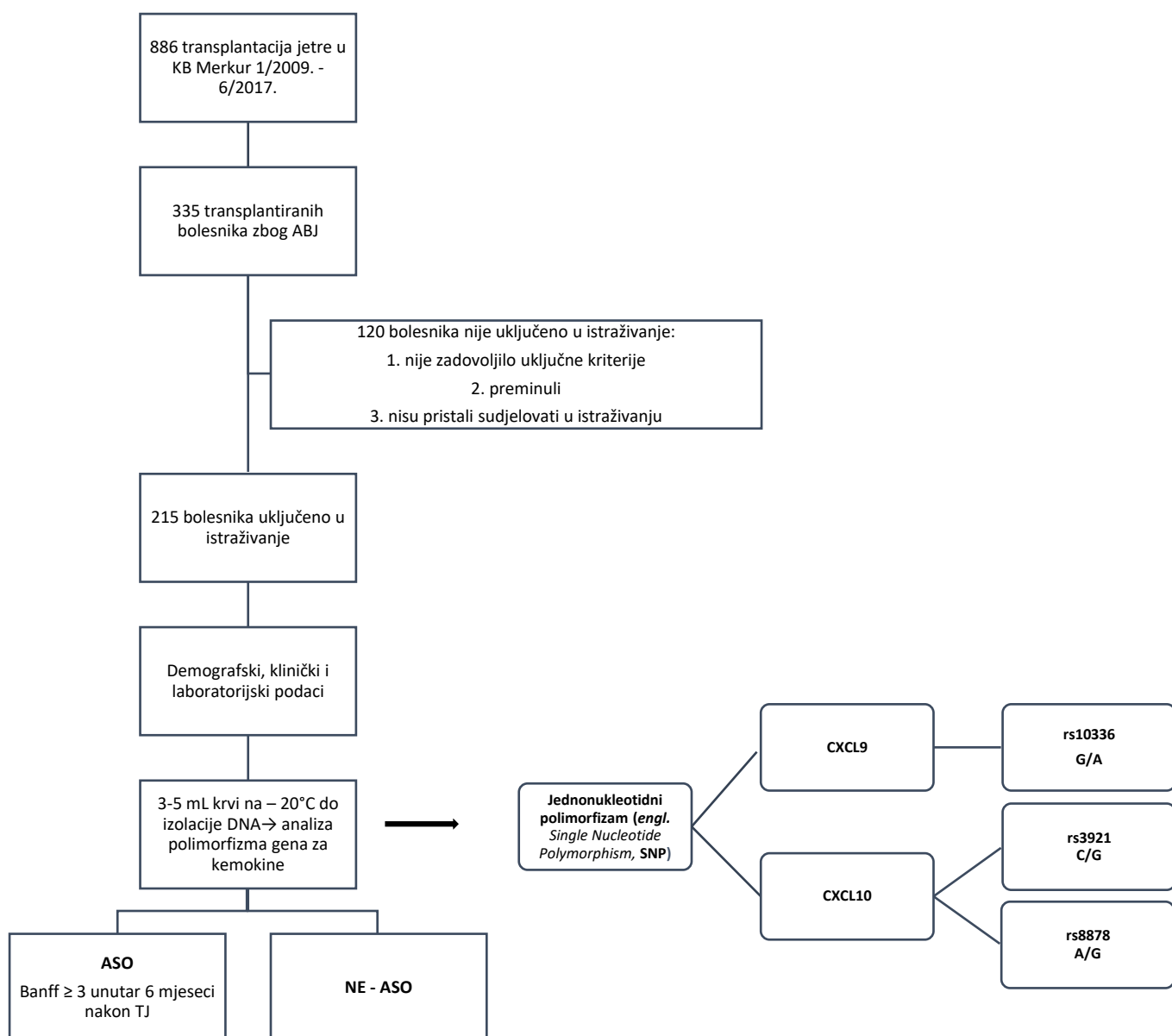
4.1.1. Imunosupresija

Svi bolesnici liječeni su identičnim imunosupresivnim protokolom koji uključuje kortikosteroide, kalcijneurinske inhibitore (takrolimus ili ciklosporin) i mikofenolat mofetil. Indukcijska imunosupresivna terapija nakon transplantacije sastojala se od visokih doza kortikosteroida te postupnog snižavanja doze kortikosteroida prema protokolu do potpunog prekida tri mjeseca nakon transplantacije jetre. Terapija održavanja sastojala se od takrolimusa ili ciklosporina te mikofenolat mofetila. Ciljna koncentracija takrolimusa bila je od 8 do 10 ng/ml prva tri mjeseca nakon transplantacije, potom od 6 do 8 ng/ml do kraja prve godine, a nakon godinu dana od transplantacije jetre oko 5 ng/ml. Ciljna doza ciklosporina bila je od 150 do 200 ng/ml do tri mjeseca nakon transplantacije jetre, potom od tri do 12

mjeseci nakon transplantacije jetre ne više od 100 ng/ml, a nakon godinu dana od 50 do 70 ng/ml. Izloženost takrolimusu ili ciklosporinu procijenjena je prema CO-koncentraciji, odnosno najnižoj koncentraciji mjerenoj 12 sati ili 24 sata nakon zadnjeg uzimanja lijeka. Izloženost mikofenolnoj kiselini nije određivana. Uz to, svi bolesnici primali su uobičajenu antimikrobnu i antivirusnu profilaksu: trimetoprim–sulfametaksazol prvih šest mjeseci i valganciklovir tijekom tri mjeseca nakon transplantacije jetre.

4.2. Metode

Za prikupljanje anamnestičkih podataka, podataka o akutnom staničnom odbacivanju i laboratorijskih nalaza bolesnika korištena je medicinska dokumentacija iz bolničkog informacijskog sustava. Na redovitoj ambulantnoj kontroli bolesnicima je uzeta dodatna epruveta venske krvi (od 3 do 5 ml), koja je bila pohranjena na -20 °C do izolacije DNA i analize polimorfizama gena za kemokine CXCL9 i CXCL10. Pohrana uzoraka, izolacija DNA te određivanje polimorfizama gena CXCL9 i CXCL10 učinjeni su u Laboratoriju za molekularnu imunologiju pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Shematski prikaz dizajna istraživanja u okviru ove disertacije prikazan je na Slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz dizajna istraživanja

4.2.1. Akutno stanično odbacivanje

Sve epizode ASO-a dijagnosticirane su isključivo na temelju patohistološke analize bioptata presatka. Za dijagnosticiranje i klasificiranje ASO-a korištena je međunarodno priznata Banff klasifikacija pri čemu je stupanj ASO-a određen prema RAI-indeksu (82). Prema navedenom bodovnom sustavu, RAI veći ili jednak tri u prvih šest mjeseci od transplantacije jetre definiran je kao ASO. U slučaju više epizoda odbacivanja u obzir se uzimala ona s najvišim stupnjem prema Banff kriterijima. Svi bolesnici podijeljeni su u dvije skupine: (1) ASO-skupina sastojala se od bolesnika koji su imali histološki dijagnosticirano akutno stanično odbacivanje u prvih šest mjeseci od transplantacije jetre i (2) ne-ASO-skupina u kojoj su bili bolesnici bez akutnog staničnog odbacivanja.

Sve biopsije jetrenog presatka bile su indikacijske. Najčešća indikacija bila je klinička sumnja na ASO na temelju porasta serumskih vrijednosti jetrenih aminotransferaza i/ili kolestatskih parametara uz slikovnim metodama morfološki uredan presadak. Biopsije su učinjene prema uobičajenom postupku pod kontrolom ultrazvuka i uporabom automatskog bioptičkog uređaja s iglom od 16 gaugea. Uzorci su pripremljeni i obojeni prema standardnim metodama pripreme histološkog preparata za dijagnostiku svjetlosnim mikroskopom i imunofluorescencijom. Bioptičke uzorke očitali su iskusni i neovisni patolozi, specijalizirani u području transplantacije jetre.

Nakon postavljanja dijagnoze ASO-a kod svih bolesnika započeto je liječenje protiv odbacivanja presatka. Ovisno o stupnju odbacivanja liječenje je uključivalo pulsne doze metilprednizolona, povišenje doze i/ili zamjenu kalcijneurinskih inhibitora.

4.2.2. Genotipizacija

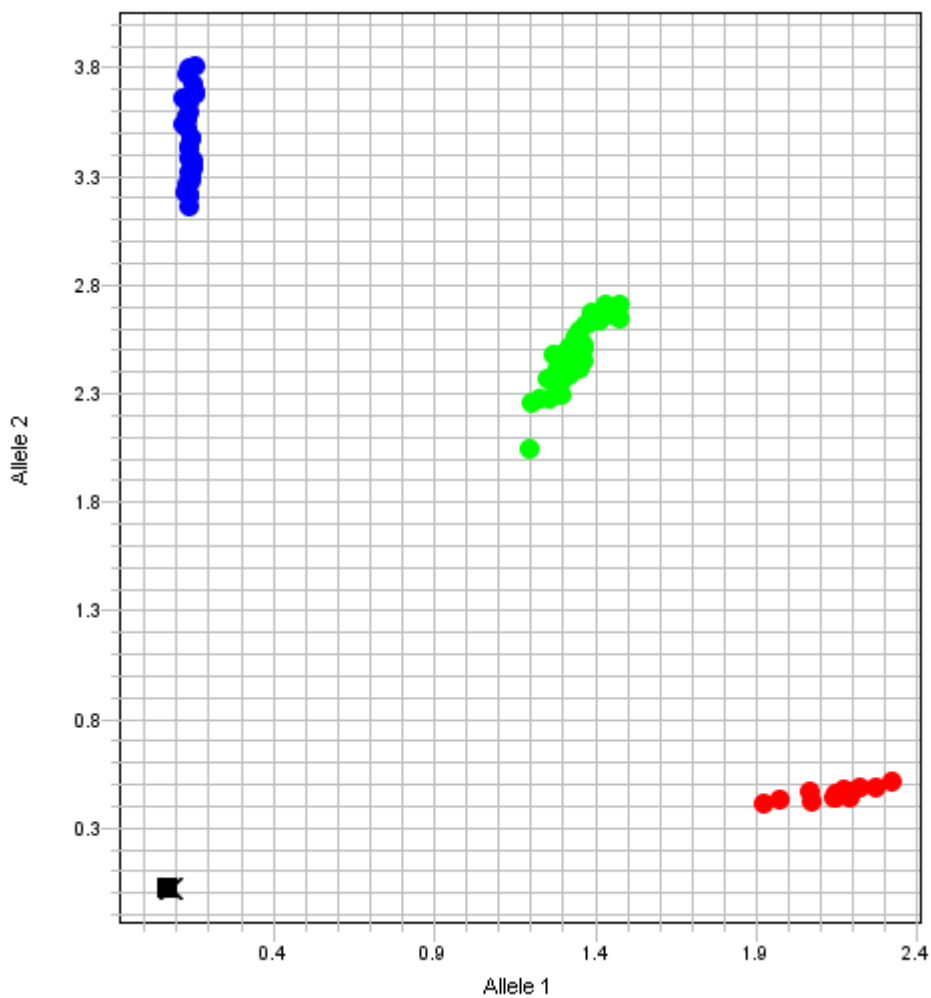
DNA je izolirana iz uzorka cijele krvi, koja je bila pohranjena na -20°C , koristeći proceduru QIAGEN QIAamp DNA blood Mini Kit spin prema uputama proizvođača. Koncentracija DNA u dobivenom uzorku određivana je pomoću spektrofotometra NanoDrop ND 1000 Spectrophotometre.

Izolirana genomska DNA analizirana je na uređaju za kvantitativnu polimeraza lančanu reakciju (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države). Polimorfizam gena

za CXCL9 (rs10336) te za CXCL10 (rs3921 i rs8878) određivan je pomoću seta kemikalija TaqMan Assay (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. TaqMan Assay sastoji se od para specifičnih začetnika i probe koja na 5' kraju ima fluorescentnu boju 6-FAM ili VIC, a na 3' kraju hvatač fluorescencije (engl. *nonfluorescent quencher*, NFQ). Proba se veže na cDNA između obaju začetnika, a produljenjem začetnika DNA polimeraza cijepa probu i odvaja fluorescentnu boju od NFQ-a, što dovodi do porasta fluorescencije sa svakim ciklusom umnažanja. Za svaki gen koristila su se dva seta s istim začetnicima i po dvije probe (označene različitim fluorescentnim bojama) od kojih je svaka specifična za određenu mutaciju. Svaka reakcija događala se u duplikatu. Konačni reakcijski volumen za PCR bio je 10 µl, koji je sadržavao 1 µl 10 ng/µl genomske DNA, 5 µl TaqMan univerzalne reakcijske smjese, 0,5 µl 200 nM VIC/FAM-označene probe te 3,5 µl redestilirane vode. Za CXCL9 rs10336, CXCL10 rs3921 i CXCL10 rs8878 koristile su se probe dostupne na sljedećim poveznicama:

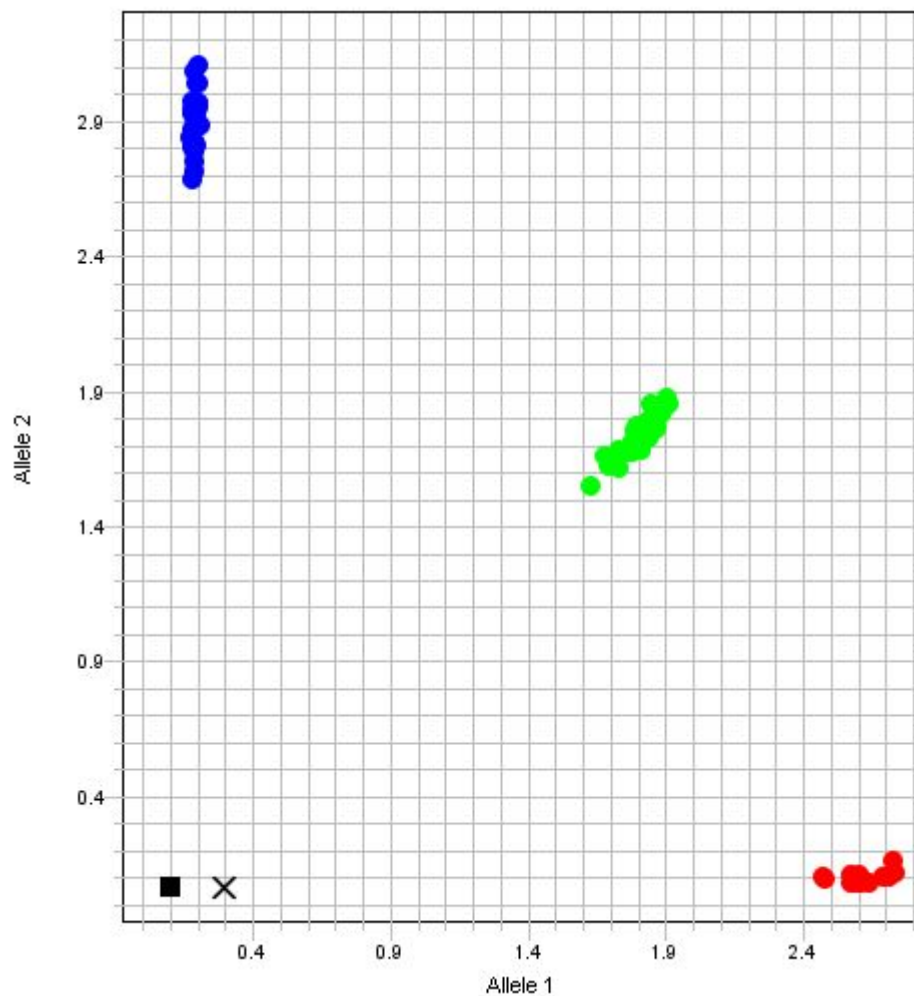
https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C___486222_10?CID=&ICID=&subtype=
https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C___497062_10?CID=&ICID=&subtype=
[https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C___482889_10?CID=&ICID=&subtype=.](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C___482889_10?CID=&ICID=&subtype=)

PCR-amplifikacija izvršavala se u pločicama s 96 jažica s pozitivnim i negativnim kontrolama. Uzorci izolirane genomske DNA, set TaqMan Assay (s dvjema fluorescentnim probama) i set kemikalija za PCR (TaqMan Genotyping Master Mix) prvo su bili inkubirani tijekom dvije minute na 50 °C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza, a potom 10 minuta na +95 °C da bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala, a aktivirala DNA polimeraza. Potom je slijedilo 40 ciklusa tijekom kojih su se uzorci inkubirali na: 95 °C tijekom 15 sekundi i 60 °C tijekom 60 sekundi. Očitavanja fluorescencije za CXCL9 i CXCL10 prikazana su grafički (Slike 4. i 5.).



Slika 4. Alelno razlikovni graf za genotipizaciju polimorfizma CXCL9 (rs10336).

Podaci su dobiveni PCR-analizom na aparatu ABI Prism 7500 uporabom eseja TaqMan za određivanje pojedinačnih genskih polimorfizama. Na x-osi prikazan je alel G, a na y-osi alel A. Plave točke označavaju prisutnost genotipa AA, genotip AG prikazan je zelenim, a genotip GG crvenim točkama. Crni kvadratić prikazuje uzorak u koji nije dodana DNA.



Slika 5. Alelni razlikovni graf za genotipizaciju polimorfizma CXCL10 (rs3921).

Podaci su dobiveni PCR-analizom na aparatu ABI Prism 7500 uporabom eseja TaqMan za određivanje pojedinačnih genskih polimorfizama. Na x-osi prikazan je alel G, a na y-osi alel C. Plave točke označavaju prisutnost genotipa CC, genotip CG prikazan je zelenim, a genotip GG crvenim točkama. Crni kvadratić prikazuje uzorak u koji nije dodana DNA.

Istraživani jednonukleotidni polimorfizmi gena za CXCL9 i CXCL10 odabrani su na temelju podataka Hapmap dostupnih na proizvođačevoj mrežnoj stranici (https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/details/genotyping/C____486222_10?CID=&ICID=&subtype=, https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/details/genotyping/C____497062_10?CID=&ICID=&subtype=) i mrežnoj stranici NCBI-a (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Odabrani su polimorfizmi kod kojih je prisutnost slabije zastupljenog alela (engl. *minor allele frequency*, MAF) u europskoj populaciji veća od 40% i za koje su dosadašnji znanstveni radovi pokazali da mogu imati utjecaj na kliničku sliku različitih bolesti u europskoj populaciji. Potrebna veličina uzorka (210 pacijenata) za snagu studije od 80% uz odgovarajuće MAF i razinu pogreške tipa 1 od 0,05 izračunata je pomoću javno dostupnog mrežnog kalkulatora (<http://osse.bii.a-star.edu.sg/calculation1.php>).

4.3. Statistička analiza

Statistička analiza podataka izvršena je pomoću računalnog programa Statistica (verzija 10) postupcima ispitivanja razlika i povezanosti. Za kontinuirane varijable određena je normalnost raspodjele korištenjem Shapiro-Wilksova testa. U slučaju normalne raspodjele podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija, odnosno kao medijan s interkvartilnim rasponom (engl. *Interquartile range*, IQR) u slučaju odstupanja od normalne raspodjele. Za usporedbu numeričkih podataka između grupa koristili su se parametrijski testovi kod normalne raspodjele (t-test i ANOVA s *post hoc* Bonferronijevim testom), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele neparametrijski testovi (Mann-Whitney U. ili Kruskal-Walis test). Korelacije među varijabama testirane su Pearsonovim testom (kod normalne raspodjele), odnosno Spearman rank testom (kod odstupanja od normalne raspodjele). Kategorijske varijable uspoređivane su hi-kvadratnim testom odnosno Kendallovim tau testom za procjenu korelacija.

Učestalost genotipova svih polimorfizama testirana je Hardy-Weinbergovim principom, odnosno jednadžbom. Za analizu genotipova korišten je dominantan, recesivan, predominantan (engl. *overdominant*) i kodominantan model. Konstruirani su modeli linearne regresije koji su uključivali životnu dob primatelja i davatelja, bodovni sustav MELD, spol primatelja te genotip CXCL9 ili CXCL10 kao neovisni prediktor, kako bi se odredila njihova

povezanost s vremenom ASO-a nakon transplantacije jetre. Za sve izračune p vrijednost manja od 0,05 uzimala se kao statistički značajna. Prisutnost Hardy-Weinbergove ravnoteže i OR-a u testiranim modelima računala se pomoću SNPstats, slobodnog programa dostupnog preko poveznice: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>.

5. REZULTATI

5.1. Opće karakteristike bolesnika i davatelja

U razdoblju od siječnja 2009. do lipnja 2017. godine transplantirano je 886 bolesnika, a od toga je 215 bolesnika zadovoljilo prije navedene uključne kriterije za predmetno istraživanje. Kod svih bolesnika radilo se o transplantaciji cijele jetre s kadaveričnog donora. Većina (86%) transplantiranih bolesnika bili su muškarci, a srednja dob bolesnika u studiji bila je $58,1 \pm 7,2$ godina. Svi bolesnici transplantirani su zbog alkoholne bolesti jetre, a u 24,2% slučajeva bolesnici su u podlozi ABJ-a imali i hepatocelularni karcinom zadovoljavajući Milanske kriterije. Bolesnicima je transplantirana jetra prosječne starosti davatelja $60,9 \pm 14,2$ godina (Tablica 2.).

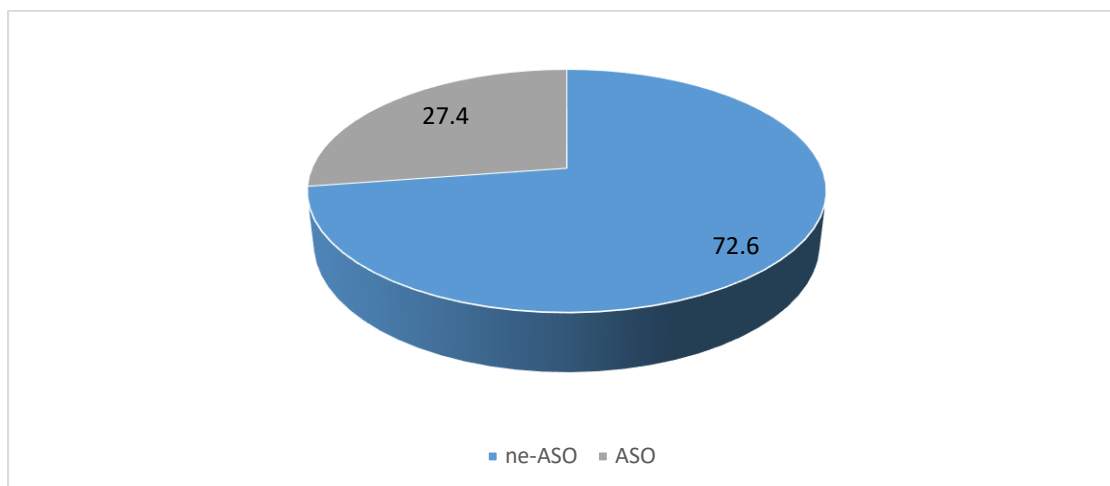
Tablica 2. Karakteristike primatelja i davatelja prilikom transplantacije jetre

Karakteristike	Ukupno n=215
Spol, n (%)	
muški	185 (86,0)
ženski	30 (14,0)
Dob primatelja, god\pmSD	58,1 \pm 7,2
HCC, n (%)	52 (24,2)
Dob davatelja, god\pmSD	60,9 \pm 14,2

SD – standardna devijacija; HCC – hepatocelularni karcinom

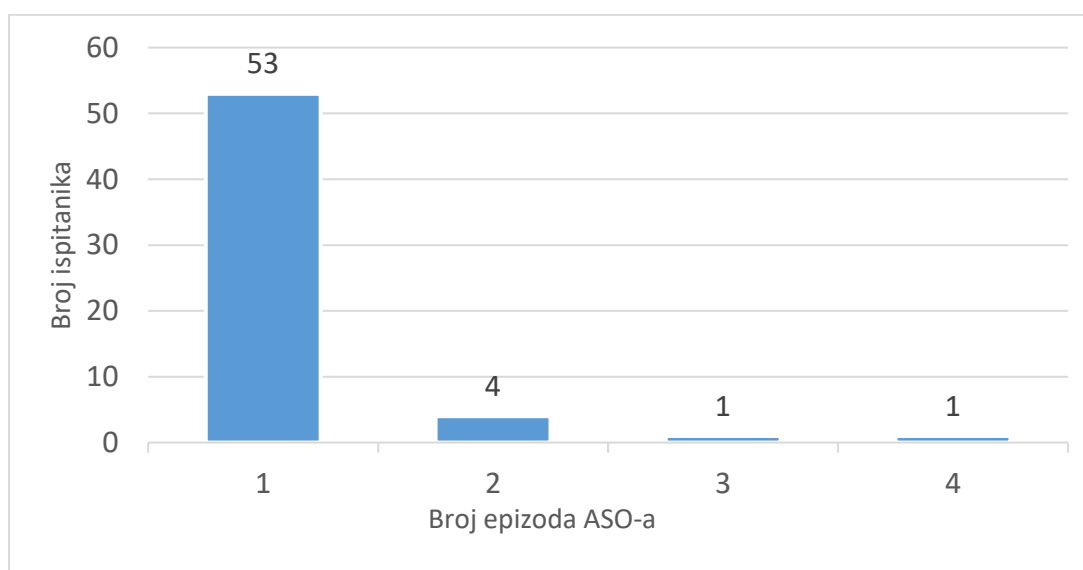
5.2. Učestalost akutnog staničnog odbacivanja nakon transplantacije jetre

Od ukupnog broja bolesnika u studiji, njih 27,4% (n=59) imalo je histološki dokazano akutno stanično odbacivanje. S druge strane, 72,6% (n=156) bolesnika nije imalo nijednu epizodu histološki dokazanog akutnog staničnog odbacivanja (Slika 6.).



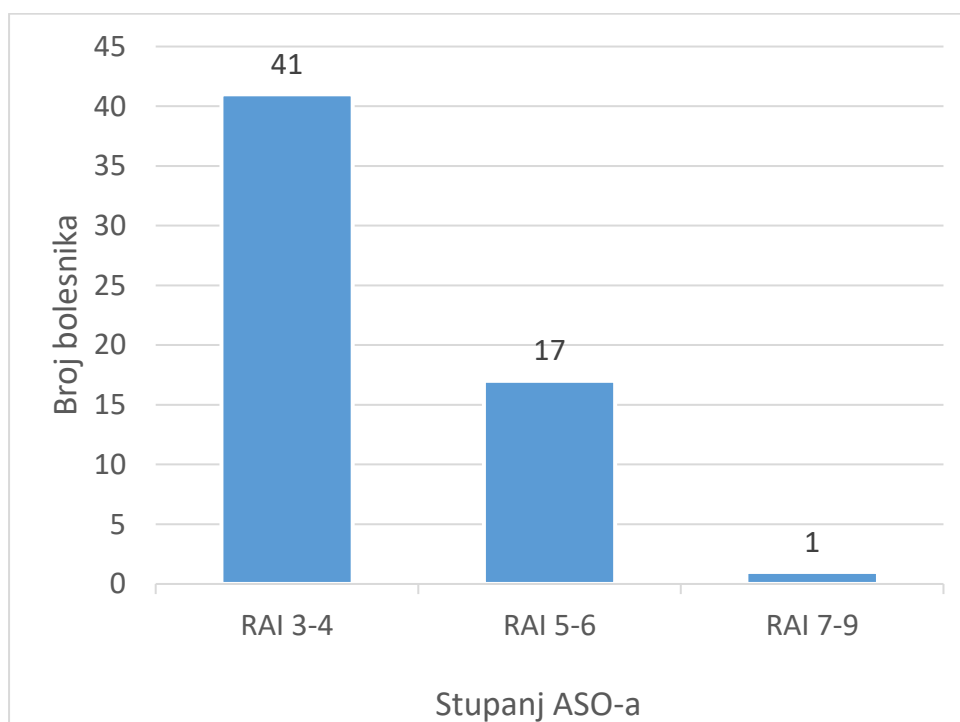
Slika 6. Učestalost ASO-a u ispitivanoj kohorti

Većina bolesnika s ASO-om (89,8 %) imala je jednu biopsijom presatka dokazanu epizodu akutnog staničnog odbacivanja. Nadalje, četiri bolesnika imala su dvije epizode ASO-a, dok je jedan bolesnik imao tri epizode ASO-a, a jedan bolesnik četiri epizode ASO-a. Kod bolesnika s više od jednom epizodom akutnog staničnog odbacivanja u daljnjoj analizi rezultata uzimalo se ono odbacivanje s najvišim RAI-indeksom (Slika 7.).



Slika 7. Broj epizoda ASO-a u skupini bolesnika s ASO-om

Zastupljenost pojedinih stupnjeva akutnog staničnog odbacivanja prema RAI-indeksu prikazana je na Slici 8. Najveći broj bolesnika s ASO-om (69,5%) imao je blagi stupanj odbacivanja (RAI 3-4), 28,8% bolesnika s ASO-om imalo je srednje teški stupanj odbacivanja (RAI 5-6) dok je jedan bolesnik imao teški stupanj akutnog staničnog odbacivanja (RAI 7-9).



Slika 8. Zastupljenost pojedinih stupnjeva ASO-a prema RAI-indeksu

Prema histološki dokazanom ASO-u bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: (1) ASO-skupina i (2) ne-ASO-skupina.

5.3. Karakteristike bolesnika ASO-skupine i ne-ASO-skupine

Prema karakteristikama primatelja prije transplantacije jetre, između ASO-skupine i ne-ASO-skupine nije bilo značajne razlike u spolu, dobi, serumskim vrijednostima kreatinina, AST-a i ALT-a primatelja i davatelja te u prevalenciji hepatocelularnog karcinoma (Tablica 3.). Nadalje, između tih skupina nije bilo razlike između vrste imunosupresivne terapije korištene nakon transplantacije jetre.

S druge strane, bolesnici koji su razvili ASO imali su značajno više vrijednosti bodovnog sustava MELD prije transplantacije jetre (ASO 17,0 vs ne-ASO 15,0; $p=0,036$). Uzevši u obzir karakteristike davatelja, između skupina nije bilo značajne razlike u spolu, ali bolesnici u ASO-skupini dobili su jetreni presadak od značajno mlađih donora nego ne-ASO-skupina ($56,4\pm 14$ vs $62,5\pm 14$ godine; $p=0,005$) (Tablica 3.).

Tablica 3. Karakteristike ASO-skupine i ne-ASO-skupine

Parametri	ASO n=59	Ne-ASO n=156	p vrijednost
Primatelj			
Dob, god±SD	56,7±7,2	58,7±7,1	0,07 ^a
Spol, n (%)			
ženski	8 (13,6)	22 (14,1)	0,92 ^b
muški,	51 (86,4)	134 (85,9)	
Prije TJ:			
MELD	17,0 (14,0-21,0)	15,0 (12,0-18,0)	0,036 ^c
kreatinin (mg/dL)	0,8 (0,68-1,18)	0,93 (0,67-1,15)	0,61 ^c
AST (IU/l)	52,0 (45,0-72,0)	50,0 (37,5-64,0)	0,39 ^c
ALT (IU/l)	29,0 (20,0-41,0)	29,0 (21,0-39,5)	0,88 ^c
HCC, n (%)	11 (19,0)	41 (26,3)	0,27 ^b
Inicijalna imunosupresija			
CyA+MMF+S, n (%)	32 (56,1)	94 (60,6)	0,55 ^b
Tac+MMF+S, n (%)	25 (43,9)	61 (39,4)	
Davatelj			
Dob, god±SD	56,4±14,0	62,5±14,0	0,005 ^a
Spol, n (%)			
ženski	17 (28,8)	52 (33,3)	0,53 ^b
muški	42 (71,2)	104 (66,7)	
AST (IU/l)	43,0 (25,0-76,0)	33,5 (21,0-65,25)	0,16 ^c
ALT (IU/L)	31,0 (19,0-60,0)	27,0 (16,0-51,75)	0,35 ^c

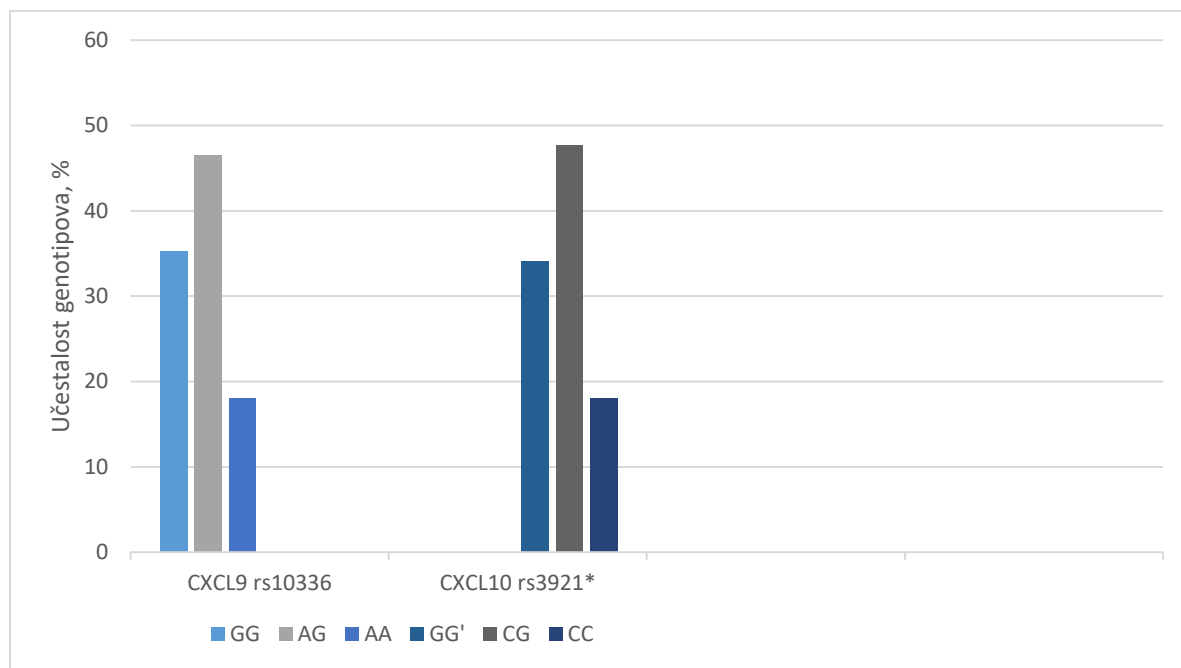
ASO – akutno stanično odbacivanje; SD – standardna devijacija; TJ – transplantacija jetre; MELD – Model For End-Stage Liver Disease; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; HCC – hepatocelularni karcinom; CyA – ciklosporin; MMF – mikofenolat mofetil; S – kortikosteroid; Tac – takrolimus
^a usporedba između skupina napravljena je Studentovim t-testom
^b usporedba između skupina napravljena je hi-kvadratnim testom
^c usporedba između skupina napravljena je Mann-Whitneyevim testom

5.4. Učestalost genotipova za polimorfizme CXCL9 (rs10336) i CXCL10 (rs3921)

U ispitivanoj skupini 76 (35,3%) bolesnika imalo je genotip GG, 100 (46,5%) bolesnika AG i 39 (18,1%) AA za polimorfizam CXCL9. Učestalost genotipova za CXCL10 polimorfizam bila je slično raspodijeljena, odnosno 73 (34,1%) bolesnika imala su GG, 102 (47,7%) bolesnika imala su CG i 39 (18,1%) bolesnika imalo je genotip CC (Slika 9.).

Kako je navedeno u dizajnu istraživanja, određen je treći polimorfizam za CXCL10 rs8878, međutim rezultati su pokazali da je on potpuno povezan s polimorfizmom za CXCL10 rs3921. Drugim riječima, koji je god uzorak imao G alel za rs3921, imao je također G alel na rs8878 te koji je god uzorak imao C na rs3921, imao je A na rs8878. Takva nerandomizirana povezanost alela na različitim genskim mjestima naziva se "neuravnotežena povezanost" (engl. *linkage disequilibrium*). S obzirom na utvrđenu potpunu povezanost između tih dvaju polimorfizama u daljnjem dijelu disertacije, rezultati za polimorfizam CXCL10 rs8878 neće se posebno navoditi kako bi se izbjeglo dupliciranje rezultata.

Genotipovi su bili u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ($p=0,57$ za CXCL9 i $p=0,76$ za CXCL10), sa značajno neuravnoteženom povezanosti između CXCL9 i CXCL10 ($D' = 0,99$, $r=0,986$).



Slika 9. Raspodjela genotipa CXCL9 i CXCL10 u ukupnoj populaciji bolesnika
* jedan je uzorak uzastopno bio neodrediv

5.5. Povezanost polimorfizma CXCL9 (rs10336) s akutnim staničnim odbacivanjem

Zastupljenost alela za polimorfizam CXCL9 (rs10336) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini prikazana je u Tablici 4. U ASO-skupini alel G imalo je 69 (58,5%) bolesnika, a alel A 49 (41,5%) bolesnika. U ne-ASO-skupini uočena je slična raspodjela, odnosno 58,6% bolesnika imalo je alel G, a 41,4% alel A. Između tih skupina nije bilo statističke značajne razlike po zastupljenosti alela (Tablica 4.).

Tablica 4. Učestalost alela za CXCL9 (rs10336) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini

Polimorfizam gena	Alel	ASO n=59	Ne-ASO n=156	OR	p vrijednost
CXCL9 (rs10336)	G, n (%)	69 (58,5)	183 (58,6)	0,99	0,97
	A, n (%)	49 (41,5)	129 (41,4)	(0,65-1,53)	

ASO – akutno stanično odbacivanje; OR – omjer izgleda

Unutar ASO-skupine 22 (37,3%) ispitanika imala su GG, 25 (43,4%) AG i 12 (20,3%) bolesnika imalo je genotip AA za polimorfizam CXCL9. Slična raspodjela genotipova uočena je i u ne-ASO-skupini u kojoj su 54 (34,6%) ispitanika imala GG, 75 (48,1%) AG i 27 (17,3%) bolesnika genotip AA. U analizi povezanosti polimorfizma CXCL9 (rs10336) i incidencije akutnog staničnog odbacivanja jetrenog presatka nije dokazana statistički značajna razlika između skupina u dominantnom ($p=0,72$), recesivnom ($p=0,61$), predominantnom ($p=0,45$), kodominantnom ($p=0,74$) i log-aditivnom modelu ($p>0,97$) (Tablica 5.).

Tablica 5. Učestalost genotipova za CXCL9 (rs10336) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini

Polimorfizam gena	Model	Genotip	ASO n=59	Ne-ASO n=156	OR ^a	p vrijednost
CXCL9 (rs10336)	Kodominantan	GG	22 (37,3%)	54 (34,6%)	1,00	0,74
		AG	25 (42,4%)	75 (48,1%)	0,82 (0,42-1,60)	
		AA	12 (20,3%)	27 (17,3%)	1,09 (0,47-2,53)	
	Dominantan	GG	22 (37,3%)	54 (34,6,8%)	1,00	0,72
		AG + AA	37 (62,7%)	102 (65,4%)	0,89 (0,48-1,66)	
	Recesivan	GG + AG	47 (79,7%)	129 (82,7%)	1,00	0,61
		AA	12 (20,3%)	27 (17,3%)	1,22 (0,57-2,60)	
	Predominantan	GG+AA	34 (57,6%)	81 (51,9%)	1,00	0,45
		AG	25 (42,4%)	75 (48,1%)	0,79 (0,43-1,45)	
	Log aditivan					1,01 (0,66-1,53)

ASO – akutno stanično odbacivanje

a omjer izgleda (OR) s 95% intervalima pouzdanosti

5.6. Povezanost polimorfizma CXCL10 (rs3921) s akutnim staničnim odbacivanjem

Raspodjela alela za polimorfizam CXCL10 (rs3921) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini bila je slična. U objema skupinama učestaliji je bio alel G (ASO-skupina 58,6%, ne-ASO-skupina 58%), dok je alel C u ASO-skupini imalo 41,4% bolesnika, a u ne-ASO-skupini 42% bolesnika (Tablica 6.).

Tablica 6. Učestalost alela polimorfizma CXCL10 (rs3921) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini

Polimorfizam gena	Alel	ASO n=59	Ne-ASO n=156	OR	p vrijednost
CXCL10 (rs3921)*	G, n(%)	68 (58,6)	180 (58)	1,02 (0,66-1,58)	0,92
	C, n(%)	48 (41,4)	130 (42)		

ASO – akutno stanično odbacivanje; OR – omjer izgleda

* jedan je uzorak uzastopno bio neodrediv

Distribucija genotipova za CXCL10 (rs3921) nije se razlikovala između ASO-skupine i ne-ASO-skupine. U ASO-skupini 21 (35,6%) ispitanik imao je genotip GG, 26 (44,1%) genotip CG i 12 (20,3%) bolesnika genotip CC. Unutar ne-ASO-skupine 52 (33,5%) ispitanika imala su genotip GG, 76 (49%) genotip CG, a 27 (17,4%) ispitanika genotip CC.

Analizom povezanosti polimorfizma CXCL10 (rs3921) s akutnim staničnim odbacivanjem u kodominantnom, dominantnom, recesivnom, predominantnom i log aditivnom modelu nije dokazana statistički značajna razlika između skupina ($p > 0,05$) (Tablica 7.).

Tablica 7. Učestalost genotipova za CXCL10 (rs3921) u ASO-skupini i ne-ASO-skupini

Polimorfizam gena	Model	Genotip	ASO n=59	Ne-ASO n=156	OR ^a	p vrijednost	
CXCL10 (rs3921)*	Kodominantan	GG	21 (35,6%)	52 (33,5%)	1,00	0,79	
		CG	26 (44,1%)	76 (49%)	0,85 (0,43-1,66)		
		CC	12 (20,3%)	27 (17,4%)	1,10 (0,47-2,57)		
	Dominantan	GG	21 (35,6%)	52 (33,5%)	1,00	0,78	
		CG + CC	38 (64,4%)	103 (66,5%)	0,91 (0,49-1,71)		
	Recesivan	GG + CG	47 (79,7%)	128 (82,6%)	1,00	0,62	
		CC	12 (20,3%)	27 (17,4%)	1,21 (0,57-2,58)		
	Predominantan	GG+CC	33 (55,9%)	79 (51%)	1,00	0,52	
		CG	26 (44,1%)	76 (49%)	0,82 (0,45-1,50)		
	Log aditivan					1,02 (0,67-1,56)	0,94

ASO – akutno stanično odbacivanje

a omjer izgleda (OR) s 95% intervalima pouzdanosti

* jedan je uzorak uzastopno bio neodrediv

5.7. Povezanost polimorfizama CXCL9 i CXCL10 s brzinom razvoja akutnog staničnog odbacivanja

Iako nije ustanovljena povezanost polimorfizama CXCL9 (rs10336) i CXCL10 (rs3921) s akutnim staničnim odbacivanjem, uočena je statistički značajna povezanost polimorfizma gena i za CXCL9 i za CXCL10 s vremenom proteklom od transplantacije jetre do razvoja akutnog staničnog odbacivanja.

Testom ANOVA utvrđena je statistički značajna razlika u vremenu do pojave ASO-a među bolesnicima s genotipom AA, AG i GG za CXCL9 ($p=0,004$) te statistički značajna razlika u vremenu do pojave ASO-a kod bolesnika s genotipom CC, CG i GG za CXCL10 ($p=0,008$) (Tablica 8.).

Ispitanici s genotipom CXCL9 AA razvili su ASO ranije (medijan pet dana, IQR 4-7,5) nego bolesnici s genotipom GG (medijan osam dana, IQR 6-18,3; Bonferronijeva korekcija $p=0,003$). Slični su rezultati dobiveni i za genotip CXCL10 (CC vs GG; Bonferronijeva korekcija $p=0,005$).

Kako bi se utvrdilo jesu li testirani genotipovi za CXCL9 i CXCL10 neovisni prediktori brzine razvoja ASO-a, konstruiran je model linearne regresije u koji su uključeni životna dob i spol davatelja i primatelja, vrijednost bodovnog sustava MELD i genotip kao prediktivna varijabla. Nakon provedene analize genotip CXCL9 i dalje je ostao statistički značajan prediktor vremena do pojave ASO-a ($\beta=0,283$; $P=0,033$). S druge strane, utjecaj genotipa CXCL10 izgubio je na statističkoj značajnosti ($\beta=0,222$; $P=0,096$).

Tablica 8. Povezanost polimorfizama CXCL9/10 s brzinom razvoja ASO-a

Genotip	CXCL9				CXCL10			
	A/A	A/G	G/G	p	C/C	C/G	G/G	p
Vrijeme do ASO-a (dani)	5,0 (4,0-7,5)	6,0 (6,0-9,0)	8,0 (6,0-18,25)	0,004	5,0 (4,0-7,5)	6,5 (6,0-9,25)	8,0 (6,0-14,5)	0,008

ASO – akutno stanično odbacivanje

5.8. Povezanost polimorfizama CXCL9 i CXCL10 sa stupnjem težine akutnog staničnog odbacivanja

Nije utvrđena statistički značajna razlika između stupnja težine akutnog staničnog odbacivanja, koji se opisuje RAI-indeksom, i genotipova za CXCL9 i CXCL10 unutar ASO-skupine (Tablica 9.). Nadalje, vrijednost RAI-a nije povezana ni s vremenom nastanka akutnog staničnog odbacivanja nakon transplantacije jetre (Kendallov tau test $\tau=0,09$; $p=0,4$) ni s protokolom inicijalne imunosupresive terapije i vremenom nastanka akutnog staničnog odbacivanja (Mann-Whitney, $p=0,11$).

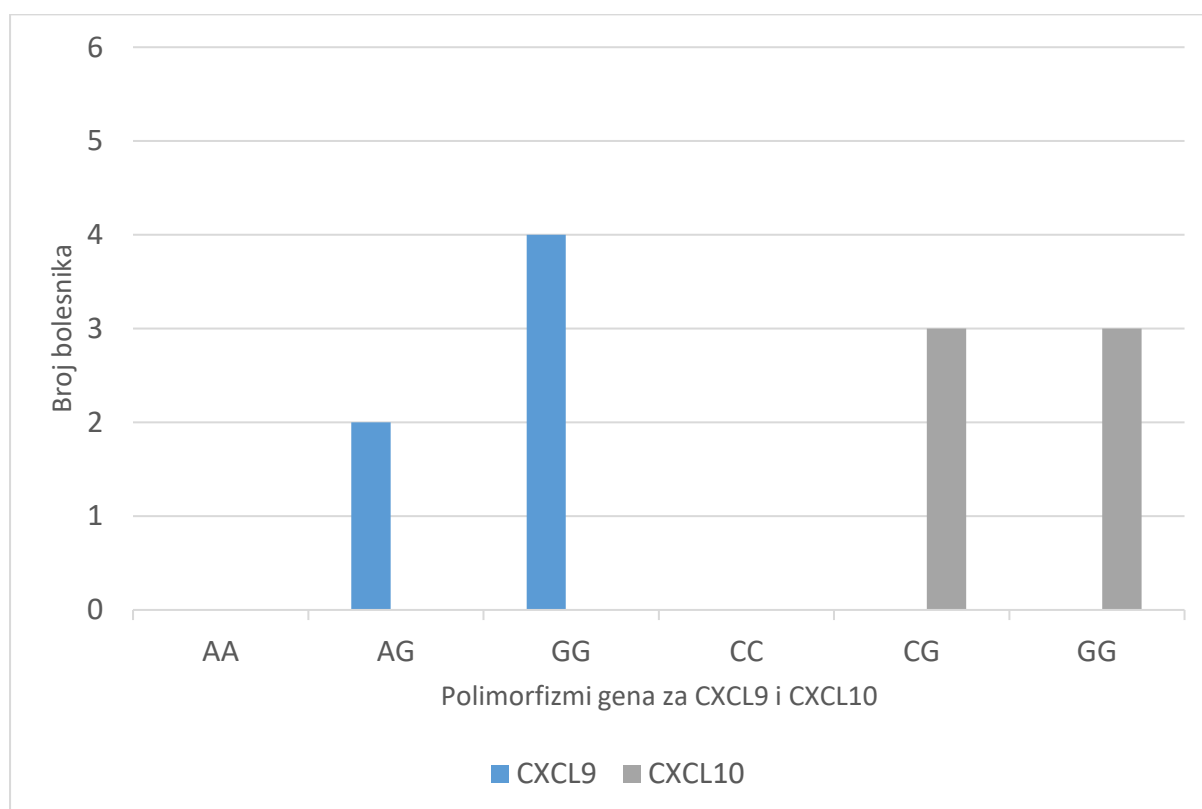
Tablica 9. Povezanost polimorfizama CXCL9 i CXCL10 s indeksom aktivnosti odbacivanja - RAI

Genotip	CXCL9				CXCL10			
	A/A	A/G	G/G	p	C/C	C/G	G/G	p
RAI	4,0 (3,0-4,75)	4,0 (4,0-5,0)	4,0 (3,0-4,25)	0,311	4,0 (3,0-4,75)	4,0 (4,0-5,0)	4,0 (3,0-4,5)	0,309

RAI - engl. rejection activity index

5.9. Povezanost polimorfizama CXCL9 i CXCL10 s brojem epizoda akutnog staničnog odbacivanja

Od ukupno 59 bolesnika s histološki dokazanim ASO-om samo njih šest imalo je više od jedne epizode odbacivanja presatka. S obzirom na malen broj bolesnika s višekratnim odbacivanjima i činjenicu da nismo našli povezanost između polimorfizama i pojavnosti akutnog staničnog odbacivanja općenito, analiza povezanosti polimorfizama gena za CXCL9 i CXCL10 i broja epizoda odbacivanja nije učinjena. Raspodjela polimorfizama kod bolesnika s višekratnim ASO-om prikazana je na Slici 8. Za polimorfizam CXCL9 dva bolesnika imala su genotip AG, a četiri bolesnika genotip GG. Za polimorfizam CXCL10 polovina bolesnika imala je genotip CG, a druga polovina genotip GG (Slika 10.).



Slika 10. Prikaz broja bolesnika koji su imali više od jedne epizode ASO-a ovisno o genotipu za CXCL9 i CXCL10.

6. RASPRAVA

Zahvaljujući usavršavanju kiruških tehnika, sve boljem postoperacijskom zbrinjavanju primatelja jetre te unapređenju imunosupresivnih protokola značajno se smanjila stopa akutnog staničnog odbacivanja i značajno se poboljšalo jednogodišnje preživljenje nakon transplantacije jetre (1, 2). S druge strane, posljedice dugotrajne izloženosti imunosupresivnoj terapiji kao što su infekcije, kardiovaskularne bolesti, bubrežna bolest i *de novo* tumori danas su vodeći uzroci smrti primatelja jetre (41, 42). Stoga je dugoročno preživljenje bolesnika nakon transplantacije jetre odnosno zbrinjavanje komplikacija imunosupresivne terapije u središtu interesa liječnika specijalista koji skrbe o transplantiranim bolesnicima.

S obzirom na navedeno, individualno i sigurno smanjivanje imunosupresivne terapije bez rizika za razvoj akutnog staničnog odbacivanja jedan je od glavnih ciljeva kako bi se poboljšao dugoročni klinički ishod i preživljenje kako primatelja tako i presatka. Paradigma da polimorfizmi citokina utječu na njihovu ekspresiju i posljedično na težinu odbacivanja presatka danas je jedna od ključnih u transplantacijskoj medicini. Kao potencijalni prediktori upalnog odgovora polimorfizmi gena za citokine mogli bi biti korisni za karakteriziranje imunotolerantnog bolesnika, odnosno bolesnika koji zahtijeva minimalnu razinu imunosupresije ili potpuno ukidanje imunosupresiva uz dugoročno urednu funkciju presatka.

Istraživanje u okviru ove disertacije provedeno je u cilju ispitivanja moguće povezanosti između polimorfizama gena za CXCL9 i CXCL10 i akutnog staničnog odbacivanja te ispitivanja povezanosti navedenih polimorfizama s vremenom pojave odbacivanja presatka, brojem epizoda odbacivanja i stupnjem odbacivanja presatka nakon transplantacije jetre.

U predmetno istraživanje uključeno je 215 bolesnika kod kojih je učinjena transplantacije jetre zbog alkoholne bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega. Kod 59 bolesnika (27,4%) histološki je dokazano akutno stanično odbacivanje, što je u skladu s učestalosti ASO-a u drugim istraživanjima prema kojima se ono javlja u 10% do 30% bolesnika (32). Većina ispitanika (89,9%) imala je jednu epizodu ASO-a te se najčešće radilo o blagom stupnju odbacivanja presatka (69,5%).

Danas je zlatni standard za postavljanje dijagnoze i stupnjevanje akutnog staničnog odbacivanja biopsija presatka i histološka evaluacija korištenjem Banff klasifikacije (82). U

većini transplantacijskih centara ne provode se protokolarne biopsije i samo bolesnici s kliničkom sumnjom na ASO, odnosno s nejasno povišenim serumskim vrijednostima jetrenih enzima, bivaju podvrgnuti biopsiji. Naime, jetreni enzimi dokazano su slabi prediktori akutnog staničnog odbacivanja. Nadalje, povišenje serumskih vrijednosti aminotransferaza ne korelira s težinom odbacivanja presatka (35).

S obzirom na to da ne postoji konsenzus o tome kako selekcionirati bolesnike za biopsiju presatka, Rodriguez-Peralvarez M. i suradnici proveli su istraživanje u cilju ispitivanja podudarnosti u odabiru bolesnika za biopsiju presatka pod sumnjom na akutno stanično odbacivanje (151). U studiju je bilo uključeno 100 primatelja jetre koji su u ranom postoperacijskom vremenu bili podvrgnuti protokolarnim biopsijama presatka. Relevantne kliničke informacije uključujući etiologiju jetrene bolesti, imunosupresivnu terapiju te dnevne serumске vrijednosti jetrenih enzima predočene su devetorima iskusnim liječnicima specijalistima iz triju etabliranih transplantacijskih centara, koji su na temelju dobivenih informacija morali odlučiti treba li bolesnik biti podvrgnut biopsiji presatka. Suglasnost među kliničarima o potrebi za biopsijom presatka bila je vrlo slaba ($\kappa < 0,40$). Dodatno, još je slabija podudarnosti između kliničke sumnje na akutno stanično odbacivanje i histoloških znakova akutnog staničnog odbacivanja u protokolarnim biopsijama ($\kappa < 0,30$) (151).

Ti rezultati zorno pokazuju subjektivnost u evaluaciji i dijagnozi akutnog staničnog odbacivanja te ukazuju na potrebu za objektivnim parametrima i biomarkerima za ASO kako bi se izbjegle nepotrebne biopsije presatka i pogrešno dijagnosticiranje.

Do sada su poznati rizični čimbenici za akutno stanično odbacivanje mlađa životna dob primatelja, povišene vrijednosti AST-a primatelja prije transplantacije jetre, donor stariji od 30 godina, podliježeća autoimuna bolest, varijabilnost serumске razine takrolimusa i povišene vrijednosti eozinofila (35, 60, 61, 63, 64, 80).

Analiza rizičnih kliničkih čimbenika za akutno stanično odbacivanje u istraživanju u okviru ove disertacije pokazala je povezanost između akutnog staničnog odbacivanja i mlađe životne dobi davatelja. To je u skladu sa studijom Onace i suradnika koja je utvrdila da su primatelji jetre stariji od 60 godina imali veću incidenciju ASO-a ako su primali organ od davatelja mlađeg od 50 godina (152). Visoko vjerojatno uzrok tome jest činjenica da se

aktivnost imunološkog odgovora sa starenjem smanjuje te da presaci od mlađih davatelja izazivaju jači imunološki odgovor.

Međutim, recentna studija koja je istraživala utjecaj transplantacije presatka od starijih davatelja nije utvrdila statistički značajnu povezanost između životne dobi davatelja i incidencije akutnog staničnog odbacivanja (153). Te razlike koje se odnose na životnu dob davatelja i akutnog staničnog odbacivanja najvjerojatnije su posljedica interakcije između dobi davatelja i drugih rizičnih čimbenika kao što su životna dob primatelja, etiologija jetrene bolesti i/ili indukcije s antagonistima IL-2 receptora (154).

Bodovni sustav MELD, prediktor tromjesečnog preživljenja bolesnika s cirozom jetre, ključan je čimbenik pri alokaciji bolesnika za transplantaciju jetre (155). Rezultati predmetnog istraživanja pokazali su povezanost između akutnog staničnog odbacivanja i visokog MELD-a. Međutim, nedostatak modela i podataka u svezi te povezanosti kao i upitna relevantnost zahtijevaju oprez u interpretaciji tog rezultata kao i potrebu za daljnjim istraživanjem opisane povezanosti.

Glavni cilj ove disertacije bio je ispitati povezanost između polimorfizama gena za CXCL9 i CXCL10 i razvoja akutnog staničnog odbacivanja jetrenog presatka u bolesnika s podliježećom alkoholnom bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili beznjega.

CXCL9 i CXCL10 kemotaktični su citokini za koje je utvrđeno da imaju ključnu ulogu u regrutaciji T-limfocita u presadak pa samim time i u akutnom staničnom odbacivanju (119, 120, 123, 124). Potencijalna vrijednost CXCL9/10 kao biomarkera uz pomoć kojih bi se moglo predvidjeti akutno stanično odbacivanje istraživana je kod bolesnika nakon transplantacije jetre, bubrega, srca i pluća (130-140).

U studiji s 94 bolesnika s transplantiranom jetrom serumske vrijednosti CXCL9 bile su značajno više prije transplantacije i prvog dana nakon transplantacije kod onih bolesnika koji su imali histološki dokazan ASO u prvih šest mjeseci od transplantacije jetre (139). To je u skladu s rezultatima studije provedene na bolesnicima s transplantiranom jetrom koja je pokazala da su visoke vrijednosti CXCL9 i CXCL10 povezane s ranom disfunkcijom presatka (137). U recentnijoj studiji evaluirani su citokini i kemokini iz seruma bolesnika nakon transplantacije jetre i utvrđeno je da kombinirano povišenje vrijednosti IL-10, IL-17 i CXCL10

jedan do dva tjedna nakon transplantacije jetre može predvidjeti akutno stanično odbacivanje sa specifičnosti od 97% i senzitivnosti od 94,9% (140).

Biomarkeri koji bi mogli s velikom sigurnošću predvidjeti akutno stanično odbacivanje za vrijeme minimizacije imunosupresivne terapije uz posljedično smanjenje njihovih nuspojava uvelike bi doprinijeli personaliziranom zbrinjavanju bolesnika nakon transplantacije jetre. Upravo su genetski biomarkeri potencijalno idealni kandidati s obzirom na to da su stabilni i moguće ih je odrediti prije transplantacije.

Do sada su polimorfizmi gena za CXCL9 i CXCL10 ispitivani kod bolesnika s fibrozom jetre, autoimunim bolestima, infektivnim bolestima i kod bolesnika s transplantiranom koštanom srži. Bruck i suradnici istraživali su polimorfizme gena za CXCL9 (rs10336, rs3733236) i CXCL10 (rs3921, rs35795399 and rs8878) kod bolesnika sa šećernom bolesti tipa 1 i nisu našli međusobnu povezanosti (156). Kotrych i suradnici istraživali su povezanost polimorfizma gena za CXCL9 (rs3733236) i CXCL10 (rs8878) s reumatoidnim artritismom te su pokazali da ispitanici s genotipom GG za CXCL10 imaju značajno učestalije ekstraartikularne manifestacije bolesti u odnosu na ispitanike s genotipom AA i AG (146).

Povezanost između polimorfizama za CXCL9-11 (rs10336 za CXCL9, rs3921 za CXCL10 i rs4619915 za CXCL11) i fibroze jetre u bolesnika s koinfekcijom virusom humane imunodeficijencije i virusom hepatitisa C prvi su put utvrdili Pineda i suradnici (149). Nedavno su i Jimenez-Sousa i suradnici ispitivali povezanost polimorfizama za CXCL9-11 (rs10336 za CXCL9, rs3921 za CXCL10 i rs4619915 za CXCL11) i fibroze jetre kod bolesnika s infekcijom HCV-om te su njihovi rezultati poduprijeli prethodno utvrđenu povezanost polimorfizama i mogućnosti razvoja fibroze jetre (157).

U transplantacijskoj medicini utjecaj jednonukleotidnog polimorfizma za CXCL10 (rs3921) na klinički ishod primatelja istraživani je do sada jedino u bolesnika koji su bili podvrgnuti transplantaciji koštane srži. Nositelji genotipa C/G i G/G imali su statistički značajno bolje petogodišnje preživljenje i nižu stopu mortaliteta povezanog s transplantacijom koštane srži u odnosu na bolesnike s genotipom C/C (150).

Prema rezultatima istraživanja u okviru ove disertacije nije ustanovljena gore navedena povezanost. Međutim, utvrđeno je da bolesnici s genotipom AA za CXCL9 razvijaju akutno stanično odbacivanje ranije u odnosu na druge bolesnike. Upravo to upućuje na

sudjelovanje kemokina CXCL9 u procesu akutnog staničnog odbacivanja. Prema sadašnjim saznanjima predmetno istraživanje prvo je koje je ispitalo povezanost između polimorfizama za CXCL9 (rs10336) i CXCL10 (rs3921) te odbacivanja presatka nakon transplantacije jetre.

Povezanost polimorfizama gena za citokine s akutnim staničnim odbacivanjem učestalo je istraživana zbog već spomenute potencijalne prednosti prijetransplantacijske analize polimorfizama gena koja bi mogla pomoći u identifikaciji grupe bolesnika pod povećanim rizikom od odbacivanja presatka, odnosno identificirati bolesnike kod kojih je klinički sigurna što ranija minimizacija imunosupresivne terapije. Međutim, rezultati se studijā razlikuju. Neki autori utvrdili su značajnu povezanost TNF- α G-308A polimorfizma s ASO-om, no isti rezultat nije potvrđen u drugim studijama (73-76, 158, 159). Nadalje, Warle i suradnici u studiji koja je uključivala 89 bolesnika ustanovili su povezanost polimorfizama gena za IL-10 G-1082A i TGF- β T869C s akutnim staničnim odbacivanjem. Međutim, ista povezanost nije ustanovljena u drugim istraživanjima (73, 75, 76).

Japanska studija provedena na 155 bolesnika kojima je presađena jetra živih davatelja identificirala je povezanost genotipa CC za polimorfizam gena IL-13 -1111 s pojavom ASO-a u prvih šest tjedna od transplantacije jetre (OR= 2,64, CI 1,19-5,86, p=0,017) (160). Dodatno, Warle i suradnici proveli su metaanalizu povezanosti ASO-a i polimorfizama gena za citokine, uključujući IL-2, IL-15, TNF- α , INF- γ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 i TGF- β 1. Prema njihovim rezultatima jedino je polimorfizam gena za IL-10-1082 bio povezan s akutnim staničnim odbacivanjem (161).

Nedovoljno velik broj ispitanika u studijama, korištenje različitih histoloških kriterija za akutno stanično odbacivanje, razlike u podliježećim bolestima jetre, razlike u imunosupresivnim protokolima te etnicitetu ispitanika neki su od mogućih razloga za nesklad rezultata navedenih studija. Nadalje, činjenica da većina istraživanja nije uspjela povezati polimorfizme gena za citokine, za koje se zna da doprinose akutnom staničnom odbacivanju, govori u prilogu kompleksnosti i važnosti posttranslacijske regulacije kemokina. Također, funkcija kemokina ne ovisi samo o njihovoj sintezi, već i o sintezi receptora preko kojih ispoljavaju učinak. Upravo je stoga moguće da bi polimorfizam gena za receptore određenih

kemokina bio bolji prediktor akutnog staničnog odbacivanja nego polimorfizam gena za kemokine. Ta hipoteza, svakako, zahtijeva dodatna istraživanja.

Nadalje, rezultati predmetne disertacije pokazuju da postoji snažna neravnoteža povezanosti (engl. *linkage disequilibrium*) između genotipova CXCL9 i CXCL10, što je u skladu s rezultatima Pineda-Tenora i suradnika (66).

Sekundarni ciljevi istraživanja u okviru ove disertacije bili su ispitivanje povezanosti polimorfizama gena CXCL9 i CXCL10 sa stupnjem težine i brojem epizoda ASO-a te analiziranje povezanosti polimorfizama s vremenom pojave akutnog staničnog odbacivanja.

Rezultati ove disertacije nisu ukazali na povezanost ispitivanih polimorfizama gena sa stupnjem težine akutnog staničnog odbacivanja prema Banff klasifikaciji. S obzirom na malen broj bolesnika (šest bolesnika) koji su imali više od jedne epizode ASO-a i činjenicu da nije utvrđena povezanost između polimorfizama i pojavnosti akutnog staničnog odbacivanja općenito, analiza povezanosti polimorfizama gena za CXCL9 i CXCL10 i broja epizoda odbacivanja nije učinjena.

Međutim, u predmetnom istraživanju utvrđena je statistički značajna povezanost između genotipova CXCL9/10 i vremena pojave akutnog staničnog odbacivanja. Medijan vremena izražen u danima do prve epizode odbacivanja presatka iznosio je sedam dana (IQR 5 -10 dana), što je u skladu s rezultatima iz prijašnjih studija (35). Nadalje, bolesnici s genotipom AA za CXCL9 i genotipom CC za CXCL10 razvili su akutno stanično odbacivanje ranije nego bolesnici s genotipom GG za CXCL9 i CXCL10. Međutim, dodatnom regresijskom analizom samo je genotip AA za CXCL9 identificiran kao neovisni prediktor za vrijeme pojave akutnog staničnog odbacivanja.

Navedena korelacija utvrđena istraživanjem u okviru ove disertacije upućuje na to da ipak postoji određena veza ispitivanih polimorfizama gena CXCL9/10 i akutnog staničnog odbacivanja. Činjenica da je polimorfizam gena CXCL9 povezan s vremenom akutnog staničnog odbacivanja ali ne sa stupnjem težine odbacivanja ukazuje nam na to da CXCL9 ima važnu ulogu u inicijaciji procesa odbacivanja. Ta teorija u skladu je s rezultatima do sada objavljenih studija koje su ispitivale ulogu CXCL9/10 u procesu akutnog staničnog odbacivanja i prema kojima navedeni kemokini imaju ključnu ulogu u regrutiranju T-limfocita u presadak (117, 121, 122).

Istraživanje u okviru ove disertacije ima nekoliko ograničenja koje je potrebno sagledati. Naime, s obzirom na to da glavni zaključak predmetnog istraživanja sugerira da ne postoji povezanost između akutnog staničnog odbacivanja i polimorfizama gena CXCL9 (rs10336) i CXCL10 (rs3921) pitanje snage studije treba analizirati. Broj bolesnika jednak je ili umjereno niži nego broj bolesnika u sličnim studijama. Nadalje, treba uzeti u obzir da je prisutnost slabije zastupljenog alela za oba gena visoka, odnosno 41,4% za CXCL9 i 42,1% za CXCL10, što značajno smanjuje broj bolesnika potrebnih za postizanje specifične snage studije. Istovjetne studije s pozitivnim rezultatima objavile su relativnu razliku u MAF-u između 40% i 50% između bolesnika koji su imali epizodu odbacivanja presatka i onih koji nisu imali epizodu akutnog staničnog odbacivanja (71, 72). Uzimajući u obzir navedena ograničenja, snaga predmetnog istraživanja iznosila je između 65% i 85%. Nadalje, p vrijednost za različite modele iznosi od 0,42 do 0,97 i daleko je od granice za statističku značajnost od 0,05, stoga je malo vjerojatno da bi povećanje broja bolesnika u istraživanju promijenilo konačni zaključak da ne postoji povezanost između akutnog staničnog odbacivanja i ispitivanih genotipova CXCL9/10.

Međutim, treba istaknuti da je testiran samo jedan polimorfizam gena za CXCL9 i samo dva za CXCL10 te da se zaključak istraživanja ne može primijeniti na druge varijante gena za CXCL9 i CXCL10. Osim toga, u predmetnom istraživanju nije analizirana ekspresija CXCR3 koja bi mogla utjecati na interpretaciju podataka. S obzirom na to da su u predmetno istraživanje uključeni jedino bolesnici kojima je presađena jetra zbog alkoholne bolesti, rezultati istraživanja ne mogu se primijeniti na skupine bolesnika transplantiranih zbog drugih etiologija jetrene bolesti. Naposljetku, u Kliničkoj bolnici Merkur ne provode se protokolarne biopsije, što znači da supklinička odbacivanja presatka nakon transplantacije jetre nisu ni analizirana.

Zaključno, unatoč prethodnim dokazima o povezanosti serumskih razina CXCL9 i CXCL10 s akutnim staničnim odbacivanjem, u predmetnom istraživanju nije nađena povezanost između ASO-a i polimorfizama za CXCL9 rs10336 i CXCL10 rs3921. Međutim, rezultati ove disertacije ne znače da njihova uloga u odbacivanju presatka nije važna, već upućuju na kompleksnost posttranslacijskih promjena ispitivanih kemokina. S druge strane, rezultati ove disertacije utvrdili su povezanost polimorfizma gena za CXCL9 i vremena pojave akutnog staničnog odbacivanja, odnosno utvrđeno je da genotip AA CXCL9 (rs10336) dovodi

do ranije pojave akutnog staničnog odbacivanja presatka kod bolesnika transplantiranih zbog alkoholne bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega.

7. ZAKLJUČAK

1. Histološkom dijagnostikom akutno stanično odbacivanje jetrenog presatka utvrđeno je kod 27,4% bolesnika nakon transplantacije jetre zbog alkoholne bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega.
2. Polimorfizmi gena za kemokine CXCL9 (rs10336) i CXCL10 (rs3921 i rs8878) nisu povezani s akutnim staničnim odbacivanjem presatka kod bolesnika nakon transplantacije jetre zbog alkoholne bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega.
3. Nije utvrđena povezanost polimorfizama gena za kemokine CXCL9 (rs10336) i CXCL10 (rs3921 i rs8878) i stupnja težine akutnog staničnog odbacivanja jetrenog presatka prema indeksu aktivnosti odbacivanja.
4. Utvrđena je statistički značajna povezanost genotipa AA za CXCL9 (rs10336) s vremenom proteklom od transplantacije jetre do razvoja akutnog staničnog odbacivanja.
5. Utvrđena je statistički značajna povezanost između akutnog staničnog odbacivanja i mlađe životne dobi davatelja te bodovnog sustava MELD kod bolesnika nakon transplantacije jetre zbog alkoholne bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega.

8. SAŽETAK

Akutno stanično odbacivanje (ASO) klinički je vrlo značajan događaj koji ugrožava preživljenje i presatka i primatelja jetre. Kemokini CXCL9/10 imaju ključnu ulogu u regrutiranju T-limfocita u presadak te su njihove povišene serumske vrijednosti povezane s pojavom ASO-a. Međutim, moguća povezanost između jednonukleotidnog polimorfizma gena (PG) za kemokine CXCL9/10 i ASO-a nakon transplantacije jetre nije do sada istražena. PG za CXCL9 (rs10336) i CXCL10 (rs3921 i rs8878) određen je polimeraza lančanom reakcijom kod 215 bolesnika koji su transplantirani zbog alkoholne bolesti jetre s hepatocelularnim karcinomom ili bez njega. Dijagnoza ASO-a histološki je utvrđena kod 27,4% bolesnika. Dokazana je povezanost između ASO-a i mlađe životne dobi davatelja te bodovnog sustava MELD. Međutim, istraživanje je utvrdilo da PG za kemokine CXCL9 (rs10336) i CXCL10 (rs3921 i rs8878) nije povezan ni s pojavnosti ASO-a ni sa stupnjem težine ASO-a nakon transplantacije jetre. Ipak, bolesnici s genotipom CXCL9 (rs10336) AA razvili su ASO značajno ranije, što upućuje na sudjelovanje CXCL9 u razvoju ASO-a.

Ključne riječi: akutno stanično odbacivanje, transplantacija jetre, polimorfizmi gena, kemokini

9. SUMMARY

Association between CXCL9 and CXCL10 chemokine gene polymorphisms and acute graft rejection after liver transplantation

Ana Ostojić, 2019

Acute cellular rejection (ACR) is a clinically important event that negatively affects the survival of the graft and the recipient. As potent T cell- chemoattractants, CXCL9 and CXCL10, have been demonstrated to play a central role in the immune response against transplant tissue, leading to ACR. While increased serum concentrations of CXCL9/10 are associated with ACR occurrence, the association between CXCL9/10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and ACR after liver transplantation (LT) remains unknown. SNPs of CXCL9 (rs10336) and CXCL10 (rs3921) were determined by polymerase chain reaction in 215 recipients transplanted due to alcoholic cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. 27.4% recipients were diagnosed with ACR that was defined as biopsy-proven within 6 months after LT. Recipients that developed ACR had significantly higher MELD scores pre-LT and received significantly younger liver grafts. There was no association between CXCL9/10 genotypes and overall incidence of ACR, the severity of ACR and the number of rejection episodes. However, patients with CXCL9 genotype AA developed ACR earlier, suggesting the involvement of CXCL9-mediated processes in ACR development.

Key words: acute cellular rejection, liver transplantation, gene polymorphisms, chemokines

10. POPIS LITERATURE

1. Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin and prednisone. *N Engl J Med.* 1981;305:266-9.
2. Shaked A, Ghobrial RM, Merion RM, Shearon TH, Emond JC, Fair JH, i sur. Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. *Am J Transplant.* 2009;9:301-8.
3. International Working Party. Terminology for hepatic allograft rejection. *Hepatology.* 1995;22:648-54.
4. Kim D, Li AA, Gadiparthi C, Khan MA, Cholankeril G, Glenn JS, i sur. Changing trends in etiology-based annual mortality from chronic liver disease, from 2007 through 2016. *Gastroenterology.* 2018;155:1154–63.
5. Bataller R, Arteel GE, Moreno C, Shah V. Alcohol-related liver disease: Time for action. *J Hepatol.* 2019;70:221–2.
6. Stein E, Cruz-Lemini M, Altamirano J, Ndugga N, Couper D, Abrales JG, i sur. Heavy daily alcohol intake at the population level predicts the weight of alcohol in cirrhosis burden worldwide. *J Hepatol.* 2016;65:998–1005.
7. Naghavi M, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, i sur. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet.* 2017;390:151–210.
8. Sheron N. Alcohol and liver disease in Europe – Simple measures have the potential to prevent tens of thousands of premature deaths. *J Hepatol.* 2016;64:957–67.
9. World Health Organisation. Global Information System on Alcohol and Health (GISAH) [Internet]. 2016. [pristupljeno 14.03.2019.]. Dostupno na: <https://www.who.int/gho/alcohol/en/>
10. Moskalewicz J, Room R, Thom B. Comparative monitoring of alcohol epidemiology across the EU. Baseline assessment and suggestions for future action. Synthesis report. Warsaw: PARPA – The State Agency for Prevention of Alcohol Related Problems; 2016.
11. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 2011;141:1572–85.
12. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines Management of alcohol-related liver disease. *J Hepatol.* 2018;69:154–81.
13. Masson S, Emmerson I, Henderson E, Fletcher EH, Burt AD, Day CP, i sur. Clinical but not histological factors predict long-term prognosis in patients with histologically advanced non-decompensated alcoholic liver disease. *Liver Int.* 2014;34:235–42.

14. Bell H, Jahnsen J, Kittang E, Raknerud N, Sandvik L. Long-term prognosis of patients with alcoholic liver cirrhosis: a 15-year follow-up study of 100 Norwegian patients admitted to one unit. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39:858–83.
15. Bambha K, Kamath PS. Model for End-stage Liver Disease (MELD). U: UpToDate, Runyon BA ur. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2018 [pristupljeno 17.03.2019.] Dostpuno na: https://www.uptodate.com/contents/model-for-end-stage-liver-disease-meld?search=meld&source=search_result&selectedTitle=1~71&usage_type=default&display_rank=1
16. Goldberg E, Chopra S. Cirrhosis in adults: Overview of complications, general management, and prognosis. U: UpToDate, Runyon BA ur. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2019 [pristupljeno 17.03.2019.] Dostpuno na: https://www.uptodate.com/contents/cirrhosis-in-adults-overview-of-complications-general-management-and-prognosis?search=child%20pugh§ionRank=1&usage_type=default&anchor=H52738331&source=machineLearning&selectedTitle=1~150&display_rank=1#H52738331
17. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C, i sur. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level. *JAMA Oncol.* 2017;3:1683–91.
18. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018;69:182-236.
19. Heckley GA, Jarl J, Asamoah BO, Ulf GG. How the risk of liver cancer changes after alcohol cessation: a review and meta-analysis of the current literature. *BMC Cancer.* 2011;11:446-55.
20. Mancebo A, Gonzalez-Dieguez ML, Cadahia V, Varela M, Perez R, Navascues CA, i sur. Annual incidence of hepatocellular carcinoma among patients with alcoholic cirrhosis and identification of risk groups. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11:95–101.
21. Ganne-Carrie N, Chaffaut C, Bourcier V, Archambeaud I, Perarnau JM, Oberti F, i sur. Estimate of hepatocellular carcinoma's incidence in patients with alcoholic cirrhosis. *J Hepatol.* 2018;69:1274–83.
22. Bucci L, Garuti F, Camelli V, Lenzi B, Farinati F, Giannini EG, i sur. Comparison between alcohol- and hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: clinical presentation, treatment and outcome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43:385–399.
23. Kim WR, Lake JR, Smith JM, Skeans MA, Schladt DP, Edwards EB, i sur. OPTN/SRTR 2015 annual data report: liver. *Am J Transplant.* 2017;17:174–251.

24. Clavien P-AP-A, Lesurtel M, Bossuyt PMM, Gores GJ, Langer B, Perrier A, i sur. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol.* 2012;13:e11–22.
25. Younossi Z, Stepanova M, Ong JP, Jacobson IM, Bugianesi E, Duseja A, i sur. Nonalcoholic steatohepatitis is the fastest growing cause of hepatocellular carcinoma in liver transplant candidates. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17:748-55.
26. Adam R, McMaster P, O’Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, i sur. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl.* 2003;9:1231–43.
27. Burra P, Mioni D, Cecchetto A, Cillo U, Zanusi G, Fagioli S, i sur. Histological features after liver transplantation in alcoholic cirrhotics. *J Hepatol.* 2001;34:716–22.
28. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, i sur. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology.* 2015;148:547–55.
29. Burra P, Senzolo M, Adam R, Delvart V, Karam V, Germani G, i sur. Liver transplantation for alcoholic liver disease in Europe: a study from the ELTR (European Liver Transplant Registry). *Am J Transplant.* 2010;10:138–48.
30. Donckier V, Lucidi V, Gustot T, Moreno C. Ethical considerations regarding early liver transplantation in patients with severe alcoholic hepatitis not responding to medical therapy. *J Hepatol.* 2014;60:866–71.
31. Lucey MMP, Morgan TR. Alcoholic Hepatitis. *N Engl J Med.* 2009;360:2758–69.
32. Levitsky J, Goldberg D, Smith AR, Mansfield SA, Gillespie BW, Merion RM, i sur. Acute Rejection Increases Risk of Graft Failure and Death in Recent Liver Transplant Recipients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15:584-93.
33. Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, O’Leary J, Randhawa PS, Feng S, i sur. Comprehensive update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: introduction of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2016;16:2816–35.
34. Wang HL. Rejection. U: Liapis H, Wang HL, ur. *Pathology of solid organ transplantation.* Berlin: Springer; 2011. str. 244–62.
35. Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK, i sur. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology.* 1998;28:638-45.
36. Fisher LR, Henley KS, Lucey MR. Acute cellular rejection after liver transplantation: variability, morbidity, and mortality. *Liver Transpl Surg.* 1995;1:10-5.

37. Charlton M, Seaberg E. Impact of immunosuppression and acute rejection on recurrence of hepatitis C: results of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Liver Transpl Surg.* 1999;5:S107-14.
38. Adams DH, Sanchez-Fueyo A, Samuel D. From immunosuppression to tolerance. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S170-85.
39. Moench C, Barreiros AP, Schuchmann M, Bittinger F, Thiesen J, Hommel G, i sur. Tacrolimus monotherapy without steroids after liver transplantation--a prospective randomized double-blinded placebo-controlled trial. *Am J Transplant.* 2007;7:1616-23.
40. Lerut JP, Pinheiro RS, Lai Q, Stouffs V, Orlando G, Juri JM, i sur. 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. *Ann Surg.* 2014;260:886-91.
41. Rubin A, Sanchez-Montes C, Aguilera V, San Juan F, Ferrer I, Moya A, i sur. Long-term outcome of 'long-term liver transplant survivors'. *Transpl Int.* 2013;26:740-50.
42. Watt KD, Pedersen RA, Kremers WK, Heimbach JK, Charlton MR. Evolution of causes and risk factors for mortality post-liver transplant: results of the NIDDK long-term follow-up study. *Am J Transplant.* 2010;10:1420-7.
43. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, i sur. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation.* 2001;72:1934-9.
44. Levitsky J, O'Leary JG, Asrani S, Sharma P, Fung J, Wiseman A, i sur. Protecting the Kidney in Liver Transplant Recipients: Practice-Based Recommendations From the American Society of Transplantation Liver and Intestine Community of Practice. *Am J Transplant.* 2016;16:2532-44.
45. Marušić M, Grčević D. Presađivanje tkiva i organa. U: Andreis I, ur. *Imunologija.* Sedmo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. Str. 340-61.
46. Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:550-7.
47. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, i sur. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004;173: 4828-37.
48. Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. T Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance transplantation. 2013;96:681-8.
49. Sussman NL, Vierling JM. Liver transplantation in adults: Overview of immunosuppression. U: UpToDate, Brown RS ur. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2018 [pristupljeno

22.03.2019.] Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/liver-transplantation-in-adults-overview-of-immunosuppression>

50. Trotter JF. Rejection and immunosuppression trends in liver transplantation. U: Clavien PD, Trotter JF, ur. *Medical Care of the Liver Transplant Patient*, 4th Edition. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2012. Str. 297-311.
51. Vacca A, Felli MP, Farina AR, Martinotti S, Maroder M, Screpanti I, i sur. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J Exp Med*. 1992;175:637-46.
52. Ray A, LaForge KS, Sehgal PB. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol*. 1990;10:5736-46.
53. Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Lafeber FP, Bijlsma JW. The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon gamma and interleukin 4 production. *Ann Rheum Dis*. 1999;58:49-54.
54. Toniutto P, Fabris C, Fumolo E, Bitetto D, Fornasiere E, Falletti E, i sur. Prevalence and risk factors for delayed adrenal insufficiency after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2008;14:1014-9.
55. O'Grady JG, Burroughs A, Hardy P, Elbourne D, Truesdale A. Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:1119-25.
56. McAlister VC, Haddad E, Renouf E, Malthaner RA, Kjaer MS, Glud LL. Cyclosporin versus tacrolimus as primary immunosuppressant after liver transplantation: a meta-analysis. *Am J Transplant*. 2006;6:1578-85.
57. 124. Haddad EM, McAlister VC, Renouf E, Malthaner R, Kjaer M, Glud LL. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2006 [pristupljeno 14.01.2019.]. Dostupno na: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD005161.pub2/full>
58. 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; 58:262.
59. Geissler EK, Schlitt HJ. Immunosuppression for liver transplantation. *Gut*. 2009;58:452-63.

60. Kueht M, Cotton RT, Galvan NT, O'Mahony CA, Goss JA, Rana A. Profiling immunologic risk for acute rejection in liver transplantation: recipient age is an important risk factor. *Transplant Immunol.* 2016;38:44–9.
61. Gaynor JJ, Moon JI, Kato T, Nishida S, Selvaggi G, Levi DM, i sur. A cause-specific hazard rate analysis of prognostic factors among 877 adults who received primary orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* 2007;84:155–65.
62. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, i sur. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology.* 2015;148:547–55.
63. Fosby B, Næss S, Hov JR, Traherne J, Boberg KM, Trowsdale J, i sur. HLA variants related to primary sclerosing cholangitis influence rejection after liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2014;20: 3986–4000.
64. Shindoh J, Akamatsu N, Tanaka T, Kaneko J, Tamura S, Sakamoto Y, i sur. Risk factors for acute liver allograft rejection and their influences on treatment outcomes of rescue therapy in living donor liver transplantation. *Clin Transpl.* 2016;30:880–5.
65. Ruiz R, Tomiyama K, Campsen J, Goldstein RM, Levy MF, McKenna GJ, i sur. Implications of a positive crossmatch in liver transplantation: a 20-year review. *Liver Transpl.* 2012;18:455–60.
66. Doran TJ, Geczy AF, Painter D, McCaughan G, Sheil AG, Süsal C, i sur. A large, single center investigation of the immunogenetic factors affecting liver transplantation. *Transplantation.* 2000;69:1491–8.
67. Shin M, Moon HH, Kim JM, Park JB, Kwon CH, Kim SJ, i sur. Significance of true-positive and false-positive pretransplantation lymphocytotoxic crossmatch in primary liver allograft outcomes. *Transplantation.* 2013;95:1410–7.
68. Kubal CA, Mangus RS, Saxena R, Lobashevsky A, Higgins N, Agarwal A, i sur. Crossmatch-positive liver transplantation in patients receiving thymoglobulin-rituximab induction. *Transplantation.* 2014;97: 56–63.
69. Dogan N, Hüsing-Kabar A, Schmidt HH, Cicinatti 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;46:3979-90.
70. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Danjoux M, Muscari F, Lavayssière L, Esposito L, i sur. High tacrolimus intra-patient variability is associated with graft rejection, and de novo donor-specific antibodies occurrence after liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2018;24:1795-802.

71. Yu X, Wei B, Dai Y, Zhang M, Wu J, Xu X, i sur. Genetic polymorphism of interferon regulatory factor 5 (IRF5) correlates with allograft acute rejection of liver transplantation. PLoS One [Internet]. 2014 Apr 30;9:e94426. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094426>
72. Zhang XX, Bian RJ, Wang J, Zhang QY. Relationship between cytokine gene polymorphisms and acute rejection following liver transplantation. Genet Mol Res [Internet]. 2016 Apr 26;15(2). Dostupno na: <https://www.geneticsmr.com/articles/6280>
73. Warlé MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, Perrey C, Zondervan PE, i sur. Cytokine gene polymorphisms and acute human liver graft rejection. Liver Transpl. 2002;8:603-11.
74. Mas VR, Fisher RA, Maluf DG, Archer KJ, Contos MJ, Mills SA, i sur. Polymorphisms in cytokines and growth factor genes and their association with acute rejection and recurrence of hepatitis C virus disease in liver transplantation. Clin Genet. 2004;65:191–201.
75. Bathgate AJ, Pravica V, Perrey C, Therapondos G, Plevris JN, Hayes PC, i sur. The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. Transplantation. 2000;69:1514–7.
76. Fernandes H, Koneru B, Fernandes N, Hameed M, Cohen MC, Raveche E, i sur. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. Transplantation. 2002;73:1886–91.
77. Marín LA, Muro M, Moya-Quiles MR, Miras M, Minguela A, Bermejo J, i sur. Study of Fas (CD95) and FasL (CD178) polymorphisms in liver transplant recipients. Tissue Antigens. 2006;67:117-26.
78. Thude H, Kramer K, Koch M, Peine S, Sterneck M, Nashan B. Lack of association between CD40 polymorphisms and acute rejection in German liver transplant recipients. Hum Immunol. 2014;75:1123-7.
79. Thude H, Schipler AD, Treszl A, Peine S, Koch M, Sterneck M, i sur. Lack of association between CTLA-4 and PDCD1 polymorphisms and acute rejection in German liver transplant recipients. Hum Immunol. 2013;74:1041-5.
80. M. Rodríguez-Perálvarez, L. De Luca, G. Crespo, Á. Rubin, S. Marín, S. Benlloch, i sur. An objective definition for clinical suspicion of T-cell mediated rejection after liver transplantation. Clin Transplant. 2017;31 <http://dx.doi.org/10.1111/ctr.13005>.
81. Rodriguez-Peralvarez M, Germani G, Papastergiou V, Tsochatzis E, Thalassinou E, Luong TV, i sur. Early tacrolimus exposure after liver transplantation: relationship with moderate/severe acute rejection and longterm outcome. J Hepatol. 2013;58:262-70.

82. Anonymous. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology*. 1997;25:658–63.
83. Prieto M, Berenguer M, Rayón JM, Córdoba J, Argüello L, Carrasco D, i sur. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology*. 1999;29:250-6.
84. Slapak GI, Saxena R, Portmann B, Gane E, Devlin J, Calne R, i sur. Graft and systemic disease in long-term survivors of liver transplantation. *Hepatology*. 1997;25:195-202.
85. Rodríguez-Perálvarez M, Rico-Juri JM, Tsochatzis E, Burra P, De la Mata M, Lerut J. Biopsy-proven acute cellular rejection as an efficacy endpoint of randomized trials in liver transplantation: a systematic review and critical appraisal. *Transpl Int*. 2016;29:961–73.
86. Rodríguez-Perálvarez M, Germani G, Tsochatzis E, Rolando N, Luong TV, Dhillon AP, i sur. Predicting severity and clinical course of acute rejection after liver transplantation using blood eosinophil count. *Transpl Int*. 2012;25:555-63.
87. Barnes EJ, Abdel-Rehim MM, Goulis Y, Abou Ragab M, Davies S, Dhillon A, i sur. Applications and limitations of blood eosinophilia for the diagnosis of acute cellular rejection in liver transplantation. *Am J Transplant*. 2003;3:432-8.
88. Calmus Y, Gane P, Rouger P, Poupon P. Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology*. 1990;11:12–5.
89. Azer SA, McCaughan GW, Stacey NH. Daily determination of individual serum bile acids allows early detection of hepatic allograft dysfunction. *Hepatology*. 1994;20:1458–64.
90. Janssen H, Lange R, Erhard J, Testa G, Malagó M, Janssen P. Serum bile acids in liver transplantation—early indicator for acute rejection and monitor for antirejection therapy. *Transpl Int*. 2001;14:429–37.
91. Muraca M, Kohlhaw K, Vilei MT, Ringe B, Bunzendahl H, Gubernatis G, i sur. Serum bile acids and esterified bilirubin in early detection and differential diagnosis of hepatic dysfunction following orthotopic liver transplantation. *J Hepatol*. 1993;17:141–5.
92. Verhelst XP, 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;43:165-78.
93. Boleslawski E, Conti F, Sanquer S, Podevin P, Chouzenoux S, Batteux F, i sur. Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection. *Transplantation*. 2004;77:1815-20.

94. Akoglu B, Kriener S, Martens S, Herrmann E, Hofmann WP, Milovic V, i sur. Interleukin-2 in CD8+ T cells correlates with Banff score during organ rejection in liver transplant recipients. *Clin Exp Med.* 2009;9:259-62.
95. Millán O, Rafael-Valdivia L, Torrademé E, López A, Fortuna V, Sánchez-Cabus S, i sur. Intracellular IFN- γ and IL-2 expression monitoring as surrogate markers of the risk of acute rejection and personal drug response in de novo liver transplant recipients. *Cytokine.* 2013;61:556-64.
96. Imagawa DK, Millis JM, Olthoff KM, Derus LJ, Chia D, Sugich LR, i sur. The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. I. Evidence that elevated levels of tumor necrosis factor- α predict rejection following orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* 1990;50:219-25.
97. Kita Y, Iwaki Y, Demetris AJ, Starzl TE. Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients. *Transplantation.* 1994;57:1037-41.
98. Fábrega E, López-Hoyos M, San Segundo D, Casafont F, Angel Mises M, Sampedro B, i sur. Serum levels of interleukin-9 during acute rejection in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2012;44:1533-5.
99. Fábrega E, López-Hoyos M, San Segundo D, Casafont F, Pons-Romero F. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2009;15:629-33.
100. Roedder S, Vitalone M, Khatri P, Sarwal MM. Biomarkers in solid organ transplantation: establishing personalized transplantation medicine. *Genome Med.* 2011;3:37-48.
101. Umeshita K, Monden M, Tono T, Hasuike Y, Kanai T, Gotoh M, i sur. Determination of the presence of interleukin-6 in bile after orthotopic liver transplantation. Its role in the diagnosis of acute rejection. *Ann Surg.* 1996;223:204–11.
102. Warlé MC, Metselaar HJ, Hop WC, Gyssens IC, Kap M, Kwekkeboom J, i sur. Early differentiation between rejection and infection in liver transplant patients by serum and biliary cytokine patterns. *Transplantation* 2003;75:146-51.
103. Kim C, Aono S, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, i sur. Significance of alanine aminopeptidase N [APN] in bile in the diagnosis of acute cellular rejection after liver transplantation. *J Surg Res.* 2012;175:138–48.
104. Ganschow R, Baade B, Hellwege HH, Broering DC, Rogiers X, Burdelski M. Interleukin-1 receptor antagonist in ascites indicates acute graft rejection after pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2000;4:289-92.
105. Harms J, Ringe B, Pichlmayr R. Postoperative liver allograft dysfunction: the use of quantitative duplex Doppler signal analysis in adult liver transplant patients. *Bildgebung.* 1995;62:124-31.

106. Bolognesi M, Sacerdoti D, Mescoli C, Nava V, Bombonato G, Merkel C, i sur. Acute liver rejection: accuracy and predictive values of Doppler US measurements—initial experience. *Radiology*. 2005;235:651-8.
107. Britton PD, Lomas DJ, Coulden RA, Farman P, Revell S. The role of hepatic vein Doppler in diagnosing acute rejection following paediatric liver transplantation. *Clin Radiol*. 1992;45:228–32.
108. Kok T, Slooff MJ, Peeters PM, Zwaveling JH, Bijleveld CM, Gi-van Loon CE, i sur. Changes in portal hemodynamics and acute rejection in the first 2 weeks after orthotopic liver transplantation. A prospective Doppler ultrasound study. *Invest Radiol*. 1996;31:774–80.
109. Crespo G, Castro-Narro G, García-Juárez I, Benítez C, Ruiz P, Sastre L, i sur. Usefulness of liver stiffness measurement during acute cellular rejection in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2016;22:298–304.
110. Cotler SJ. Treatment of acute cellular rejection of the liver allograft. U: UpToDate, Brown RS ur. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2018 [pristupljeno 22.03.2019.] Dostupno na: https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-acute-cellular-rejection-of-the-liver-allograft?search=acute%20cellular%20rejection%20liver&source=search_result&selectedTitle=2~150&usage_type=default&display_rank=2
111. Volpin R, Angeli P, Galioto A, Fasolato S, Neri D, Barbazza F, Merenda R, i sur. Comparison between two high-dose methylprednisolone schedules in the treatment of acute hepatic cellular rejection in liver transplant recipients: a controlled clinical trial. *Liver Transpl*. 2002; 8:527-34.
112. Tan J, Zhou G. Chemokine receptors and transplantation. *Cell Mol Immunol*. 2005;2:343–9.
113. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001;2:95–101.
114. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol*. 2001;2:108–15.
115. Rot A, von Adrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:891–928.
116. Thelen M, Thelen S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol*. 2008;198:9–13.
117. Romagnani P, Crescioli C. CXCL10: a candidate biomarker in transplantation. *Clin Chim Acta*. 2012;413:1364–73.
118. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, i sur. IUIS/WHO subcommittee on chemokine nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22:1067–8.

119. Heeger PS. T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am J Transplant.* 2003;3:525–33.
120. Hidalgo LG, Halloran PF. Role of IFN-gamma in allograft rejection. *Crit Rev Immunol.* 2002;22:317–49.
121. Heidt S, San Segundo D, Shankar D, Mittal S, Muthusamy AS, Friend PJ. Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplant.* 2011;92:1–9.
122. Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr Rev.* 2007;28:492–520.
123. Hall BM, Dorsch SE. Cells mediating allograft rejection. *Immunol Rev.* 1984;77:31–59.
124. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleen. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med.* 1990;171:307–14.
125. Hancock WW, Lu B, Gao W, Csizmadia V, Faia K, King JA, i sur. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med* 2000;192:1515–20.
126. Barker CE, Ali S, O'Boyle G, Kirby JA. Transplantation and inflammation: implications for the modification of chemokine function. *Immunology.* 2014;143:138–45.
127. 74. Halloran PF, Fairchild RL. The puzzling role of CXCR3 and its ligands in organ allograft rejection. *Am J Transplant.* 2008;8:1578–79.
128. 75. Fahmy NM, Yamani MH, Starling RC, Ratliff NB, Young JB, McCarthy PM, i sur. Chemokine and receptor-gene expression during early and late acute rejection episodes in human cardiac allografts. *Transplantation.* 2003;75:2044–7.
129. 76. Fahmy NM, Yamani MH, Starling RC, Ratliff NB, Young JB, McCarthy PM, i sur. Chemokine and chemokine receptor gene expression indicates acute rejection of human cardiac transplants. *Transplantation.* 2003;75:72–8.
130. Jackson JA, Kim EJ, Begley B, Cheeseman J, Harden T, Perez SD, i sur. Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection. *Am J Transplant.* 2011;11:2228–34.
131. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, Poggio ED, Rush D, Newell KA, i sur. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant.* 2013;13:2634–44.
132. Tatapudi RR, Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Li B, Sharma VK, i sur. Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int.* 2004;65:2390–7.

133. Hoffman SA, Wang L, Shah CV, Ahya VN, Pochettino A, Olthoff K, i sur. Lung Transplant Outcomes Group. Plasma cytokines and chemokines in primary graft dysfunction post-lung transplantation. *Am J Transplant*. 2009;9:389–96.
134. Lazzeri E, Rotondi M, Mazzinghi B, Lasagni L, Buonamano A, Rosati A, i sur. High CXCL10 expression in rejected kidneys and predictive role of pretransplant serum CXCL10 for acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Transplant*. 2005;79:1215–20.
135. Crescioli C, Buonamano A, Scolletta S, Sottili M, Francalanci M, Giomarelli P, i sur. Predictive role of pretransplant serum CXCL10 for cardiac acute rejection. *Transplant*. 2009;87:249–55.
136. Karason K, Jernas M, Hagg DA, Svensson PA. Evaluation of CXCL9 and CXCL10 as circulating biomarkers of human cardiac allograft rejection. *BMC Cardiovasc Disord*. 2006;19:6–29.
137. Friedman BH, Wolf JH, Wang L, Putt ME, Shaked A, Christie JD, i sur. Serum cytokine profiles associated with early allograft dysfunction in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl*. 2012;18:166-76.
138. Asaoka T, Marubashi S, Kobayashi S, Hama N, Eguchi H, Takeda Y, i sur. Intra-graft transcriptome level of CXCL9 as biomarker of acute cellular rejection after liver transplantation. *J Surg Res*. 2012;178:1003-14.
139. Raschzok N, Reutzel-Selke A, Schmuck RB, Morgul MH, Gauger U, Prabowo KA, i sur. CD44 and CXCL9 serum protein levels predict the risk of clinically significant allograft rejection after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2015;21:1195-207.
140. Kim N, Yoon YI, Yoo HJ, Tak E, Ahn CS, Song GW, i sur. Combined Detection of Serum IL-10, IL-17, and CXCL10 Predicts Acute Rejection Following Adult Liver Transplantation. *Mol Cells*. 2016;39:639-44.
141. Xu Z, Liu Y, Liu L, Li X, Bai S, Rong Y, i sur. Association of interferon-gamma induced protein 10 promoter polymorphisms with the disease progression of hepatitis B virus infection in Chinese han population. *PLoS One* [Internet]. 2013 Sep 4;8:e72799. Dostupno na: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072799>
142. Deng G, Zhou G, Zhang R, Zhai Y, Zhao W, Yan Z, i sur. Regulatory polymorphisms in the promoter of CXCL10 gene and disease progression in male hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology*. 2008;134:716–26.
143. Wasmuth HE, Lammert F, Zaldivar MM, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Scholten D, i sur. Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans. *Gastroenterology*. 2009;137:309–19.

144. Tang NL, Fan HP, Chang KC, Ching JK, Kong KP, Yew WW, i sur. Genetic association between a chemokine gene CXCL-10 (IP-10, interferon gamma inducible protein 10) and susceptibility to tuberculosis. *Clin Chim Acta*. 2009;406:98–102.
145. Brück P, Bartsch W, Penna-Martinez M, Kahles H, Seidl C, Böhme A. Polymorphisms of CXCR3-binding chemokines in type 1 diabetes. *Hum Immunol*. 2009;70:552-5.
146. Kotrych D, Dziedziejko V, Safranow K, Drozdik M, Pawlik A. CXCL9 and CXCL10 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2015;35:1319-23.
147. Galimberti D, Scalabrini D, Fenoglio C, Comi C, De Riz M, Venturelli E, i sur. CXCL10 haplotypes and multiple sclerosis: association and correlation with clinical course. *Eur J Neurol*. 2007;14:162-7.
148. Klich I, Fendler W, Wyka K, Młynarski W. Effect of the IP10 (CXCL10) and HLA genotype on the risk of type 1 diabetes in children. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2011;17:10-3.
149. Pineda-Tenor D, Berenguer J, García-Álvarez M, Guzmán-Fulgencio M, Carrero A, Aldámiz-Echevarria T, i sur. Single nucleotide polymorphisms of CXCL9-11 chemokines are associated with liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015;68:386-95.
150. Nakata K, Takami A, Espinoza JL, Matsuo K, Morishima Y, Onizuka M, i sur. The recipient CXCL10 + 1642C>G variation predicts survival outcomes after HLA fully matched unrelated bone marrow transplantation. *Clin Immunol*. 2013;146:104-11.
151. Rodriguez-Peralvarez M, Garcia-Caparros C, Tsochatzis E, Germani G, Hogan B, Poyato-González A, i sur. Lack of agreement for defining 'clinical suspicion of rejection' in liver transplantation: a model to select candidates for liver biopsy. *Transpl Int*. 2015;28:455-64.
152. Onaca N, Mckenna G, Testa G, Ruiz R, Campsen J, Levy M, i sur. Lower Incidence of Acute Cellular Rejection in Liver Transplant Recipients More than 60 Years of Age Allows Minimization of Immunosuppression. *Transplantation*. 2012;94:132.
153. Kamo N, Kaido T, Hammad A, Ogawa K, Fujimoto Y, Uemura T, i sur. Impact of Elderly Donors for Liver Transplantation: A Single-Center Experience Naoko. *Liver Transplant*. 2015;21:591–8.
154. Au KP, Chan SC, Chok KSH, Sharr WW, Dai WC, Sin SL, i sur. Clinical factors affecting rejection rates in liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015;14:367–373.
155. Edwards E, Harper A. Application of a continuous disease severity score to the OPTN liver waiting list. *Clin Transpl*. 2001;1:19-24.
156. Brück P, Bartsch W, Penna-Martinez M, Kahles H, Seidl C, Böhme A, i sur. Polymorphisms of CXCR3-binding chemokines in type 1 diabetes. *Hum Immunol*. 2009;70:552–5.

157. Jiménez-Sousa MÁ, Gómez-Moreno AZ, Pineda-Tenor D, Medrano LM, Sánchez-Ruano JJ, Fernández-Rodríguez A, i sur. CXCL9-11 polymorphisms are associated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a cross-sectional study. *Clin Transl Med.* 2017;6:26-35.
158. Jonsson JR, Hong C, Purdie DM, Hawley C, Isbel N, Butler M, i sur. Role of cytokine gene polymorphisms in acute rejection and renal impairment after liver transplantation. *Liver Transplant.* 2001;7:255–63.
159. Jazrawi SF, Zaman A, Muhammad Z, Rabkin JM, Corless CL, Olyaei A, i sur. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms and the risk of rejection after liver transplantation: a case control analysis of 210 donor recipient pairs. *Liver Transplant.* 2003;9:377–82.
160. Kamei H, Masuda S, Nakamura T, Ishigami M, Fujimoto Y, Ogura Y, i sur. Cytokine gene polymorphisms in acute cellular rejection following living donor liver transplantation: analysis of 155 donor-recipient pairs. *Hepatol Int.* 2013;7:916-22.
161. Warle MC, Metselaar HJ, Hop WC, Tilanus HW. Cytokine gene polymorphisms and acute liver graft rejection: a meta-analysis. *Liver Transplant.* 2005;11:19–26.

11. ŽIVOTOPIS

Ana Ostojić rođena je 1989. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2014. godine s odličnim prosjekom ocjena. U ožujku 2015. godine započela je specijalizaciju iz gastroenterologije u Kliničkoj bolnici Merkur te je iste godine upisala doktorski studij Biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. U travnju 2018. godine stekla je certifikat ECFMG (*Educational Commission For Foreign Medical Graduates*) koji joj je omogućio edukaciju iz područja hepatologije u Houston Methodist Hospital u Houstonu (SAD). Aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima i tečajevima. Autorica je nekoliko stručnih i znanstvenih članaka objavljenih u međunarodno indeksiranim časopisima. Od 2015. godine sudjeluje u nastavi predmeta Temelji liječničkog umijeća kao vanjski suradnik Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Član je Hrvatskog gastroenterološkog društva i European Association for the Study of the Liver Diseases.