

Čimbenici rizika i etiologija kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre

Mrzljak, Anna

Doctoral thesis / Disertacija

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:030333>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-21**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anna Mrzljak

**Čimbenici rizika i etiologija kronične
bubrežne bolesti nakon transplantacije
jetre**

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Disertacija je izrađena na Klinici za unutarnje bolesti KB Merkur u Zagrebu i Kliničkom zavodu za patologiju KB Dubrava u Zagrebu.

Voditelj rada: doc.dr.sc. Mladen Knotek

Prvenstveno se zahvaljujem svom mentoru doc.dr.sc. Mladenu Knoteku na savjetima, strpljenju i neiscrpoj energiji.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. D. Galešić Ljubanović, doc.dr.sc. R. Žunec, i bacc.med.teh. S. Stublić, svim kolegama s Odjela za gastroenterologiju, Zavoda za kliničku kemiju, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju te svim članovima transplantacijskog tima KB Merkur, kao i Kliničkom zavodu za patologiju KB Dubrava na svesrdnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i pomoći.

Rad posvećujem prof.dr.sc. Mirjani Sabljari Matovinović

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Definicija kronične bubrežne bolesti.....	1
1.2	Prevalencija kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre.....	2
1.3	Praćenje bubrežne funkcije nakon transplantacije jetre	3
1.4	Faktori koji utječu na razvitak bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre	5
1.4.1	Bubrežna funkcija prije transplantacije jetre.....	5
1.4.2	Demografski faktori i komorbiditeti.....	6
1.4.3	Perioperativni faktori.....	6
1.4.4	Kalcineurinski inhibitori	7
1.5	Prevenција oštećenja bubrežne funkcije nakon TJ.....	13
2	CILJEVI RADA I HIPOTEZA	16
3	MATERIJALI I METODE.....	17
3.1	Ispitanici.....	17
3.2	Protokol studije	17
3.3	Biokemijski parametri	19
3.4	HLA tipizacija	19
3.5	Akutno odbacivanje jetre	20
3.6	Određivanje bubrežne funkcije	20
3.7	Biopsija bubrega.....	21
3.8	Patohistološka analiza	21
3.9	Statističke metode	22
4	REZULTATI.....	24
4.1	Dijagnostičke skupine bolesnika	25
4.2	Karakteristike bolesnika prije i nakon transplantacije jetre	26
4.3	Preživljenje bolesnika	31
4.4	Preživljenje presadaka.....	31
4.5	Bubrežna funkcija nakon transplantacije jetre	34
4.6	Incidencija kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre.....	43

4.7	Analiza čimbenika rizika za razvitak novonastale kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre	45
4.8	Etiologija kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre.....	48
5	RASPRAVA.....	60
6	ZAKLJUČCI	70
7	SAŽETAK.....	71
8	SUMMARY	73
9	LITERATURA	75
10	POPIS SLIKA I TABLICA	85
11	POPIS SKRAĆENICA I SIMBOLA	88
12	ŽIVOTOPIS	89

1 UVOD

Transplantacija jetre (TJ) etablirana je metoda liječenja terminalne kronične bolesti jetre i akutnog zatajenja jetre. Razvojem imunosupresivnih lijekova, u početku azatioprina i metilprednizolona, a kasnije mikofenolne kiseline (*eng.* mycophenolic acid, MPA), kalcineurinskih inhibitora (*eng.* calcineurin inhibitor, CNI), inhibitora proliferacijskog signala (*eng.* mammalian target of rapamycin, mTOR) i monoklonalnih antitijela započela je era velikih pomaka u transplantacijskoj medicini. Usavršenje kirurške tehnike kao i snažnija imunosupresija rezultirala je sve dužim preživljenjem kako grafta tako i bolesnika, s posljedičnim sve većim teretom kroničnih komplikacija nakon transplantacije jetre. Kod bolesnika nakon transplantacije jetre oštećenje bubrežne funkcije je često i u značajnoj mjeri pridonosi morbiditetu i mortalitetu tih bolesnika [1, 2]. Iako su neke dosadašnje studije pokušale rasvijetliti mehanizme nastanka KBB kao i strategije očuvanja bubrežne funkcije nakon TJ, spoznaje o faktorima rizika i etiologiji kronične bubrežne bolesti u toj populaciji su ograničene. Osobito nedostaju istraživanja etiologije bubrežne bolesti nakon TJ temeljene na patohistologiji bubrega. Radi proširenosti tog problema u tako rastućoj populaciji bolesnika, potrebno je pravovremeno identificirati bolesnike s povišenim rizikom za razvoj bubrežnog oštećenja, identificirati etiološke faktore, te razvijati i primjeniti renoprotektivne strategije.

1.1 Definicija kronične bubrežne bolesti

Kronična bubrežna bolest (KBB) definirana je smanjenjem funkcije bubrega koje traje više od 3 mjeseca. Glavni kriterij za određivanje stadija bubrežne bolesti jest veličina glomerularne filtracije (GFR).

Prema „The National Kidney Foundation“ i „Kidney/Disease Outcomes Quality Initiative“ (NKF K/DOQI) smjernicama [3], KBB je podijeljena u 5 osnovnih stadija (Tablica 1).

Tablica 1. Stadiji kronične bubrežne bolesti.

DEFINICIJA KRONIČNE BUBREŽNE BOLESTI NKF K/DOQUI. Am J Kidney Dis 2002		
stadij	opis	GFR (ml/min/1.73m ²)
1.	oštećenje bubrega s normalnom ili ↑ GFR	≥ 90
2.	blago oštećenje	60-89
3.	umjereno oštećenje	30-59
4.	teško oštećenje	15-29
5.	bubrežno zatajenje	< 15

Karakteristika 1. stadija KKB je uredna ili povećana GFR uz nalaz bubrežnog oštećenja (proteinurija ili patološki sediment urina). U stadiju 1 i 2 bolesnici nemaju simptoma, odnosno ako su prisutni vezani su za osnovnu bolest. KKB u stadiju 3 i 4 očituje se kliničkom slikom i laboratorijskim poremećajima. Stadij 3 definiran GFR od 59-30 ml/min/1.73 m², karakterizira zadržavanje dušičnih tvari u krvi (ureje, kreatinina i mokraćne kiseline) uz pojavu komplikacija: normocitne anemije, opće slabosti, razvoja metaboličke bolesti kostiju, elektrolitskih poremećaja (natrija i kalija) i poremećaja acidobaznog statusa. Daljnjim napredovanjem smanjenja bubrežne funkcije u stadij 5 (GFR <15 ml/min/1.73m²) nastaje pogoršanje u sastavu tjelesnih tekućina, elektrolita, acidobaznog statusa te se razvijaju kardiovaskularne, gastrointestinalne, hematološke i endokrinološke komplikacije. KKB 5. stadija označava terminalno zatajenje bubrega, te zahtjeva primjenu nadomjesnog bubrežnog liječenja (dijalize ili transplantacije bubrega) [4].

Definicija kroničnog bubrežnog oštećenja jednaka je kod netransplantiranih kao i transplantiranih bolesnika.

1.2 Prevalencija kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre

Najveća do sada provedena studija prevalencije kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije solidnih organa (Ojo i suradnici [1]) koristila se podacima Američkog registra transplantiranih bolesnika i definirala je KKB glomerularnom filtracijom manjom od 30 ml/min/1.73m² prema „Modification of Diet in Renal Disease Study Group“ (MDRD) formuli (stadij 4

i 5 bubrežnog zatajenja). Petogodišnja prevalencija 4. i 5. stadija KBB nakon TJ iznosila je 18,1%, a rizik od smrtnosti u toj populaciji povećao se za 2-3 puta. U 4% bolesnika bilo je nužno primjeniti jedan od oblika bubrežnog nadomjesnog liječenja s prosječnim trajanjem oko 3 godine do transplantacije bubrega. Dakako da bi šira definicija KBB, $GFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ ili prisustvo albuminurije, dovela do značajno veće prevalencije KBB. Manjkavost navedene studije je i to da se nije bavila etiologijom KBB.

Koristeći NKF K/DOQI klasifikaciju KBB O'Riordan i suradnici su na populaciji od 2300 bolesnika nakon TJ objavili prevalenciju pojedinih stadija KBB. Desetogodišnja kumulativna incidencija KBB prema stadijima iznosila je: 2,26% za stadij 5; 6,11% za stadij 4; 56,77% za stadij 3 i 23,71% za stadij 2 dok su ostali imali 1. stadij KBB ili urednu bubrežnu funkciju [5]. U studiji je nedostavno obrađena etiologija bubrežne bolesti.

Patohistološke studije koje rasvjetljavaju etiologiju KBB općenito su rijetke i provedene na relativno malom broju bolesnika [6, 7, 8, 9, 10, 11]. U najvećim studijama do sada, 2009 godine O'Riordan i suradnici pokazali su kao dominantan uzrok kalcineurinsku nefrotoksičnost u 46% slučajeva KBB [7], dok su nedavno Kim JY i suradnici na populaciji predominantno HCV-pozitivnih bolesnika, prikazali da su u 42% slučajeva za nastanak KBB nakon TJ odgovorne primarne bolesti glomerula, a u 16% slučajeva kalcineurinska nefrotoksičnost [8]. Obje studije nedostatne su sa strane incidencije novonastale KBB.

Aktualni rastući trend transplantiranih bolesnika, kao i sve dužeg preživljenja nakon TJ navedenoj populaciji nameće teret kroničnih komplikacija, stoga se u budućnosti može očekivati proporcionalni porast razvoja kronične bubrežne bolesti.

U dosadašnjim istraživanjima nedostatan je sveobuhvatni prikaz incidencije i etiologije novonastale KBB nakon TJ, a posebice distribucije pojedinih stadija kronične bolesti bubrega.

1.3 Praćenje bubrežne funkcije nakon transplantacije jetre

Aдекватно praćenje bubrežne funkcije neophodno je za detekciju i prevenciju bubrežnog oštećenja nakon transplantacije jetre. Prevalencija kronične bolesti bubrega nakon TJ javlja se u

rasponu od 10 do 90 % [1, 5, 12]. Taj široki raspon može se objasniti obuhvaćanjem u istraživanja bolesnika s različitim stadijima KBB, različitom etiologijom bolesti jetre u različitim populacijama, različitoj imunosupresiji u različitim centrima, ali i nedostacima metoda procjene GFR koji ovise o kreatininu u serumu [13].

Razina kreatinina u serumu je uobičajeni i sveopće prihvaćen parametar praćenja bubrežne funkcije. Njegova interpretacija međutim ovisi o mišićnoj masi bolesnika i bubrežnom tubularnom izlučivanju. S obzirom na mišićnu masu sastav tijela se može značajno mijenjati osobito uslijed dugotrajne bolesti i liječenja, čime se neizbježno mijenja i koncentracija kreatinina u serumu. Bolesnici sa terminalnom bolesti jetre koji predstavljaju većinu kandidata za TJ često imaju manju mišićnu masu, a time i nižu proizvodnju kreatinina nego populacija na kojoj su razvijene formule za određivanje GFR. Time se ograničava točnost procjene bubrežne funkcije [14, 15].

Metode određivanja bubrežne funkcije procjenom GFR u ne-transplantiranoj i transplantiranoj populaciji su jednake te uključuju; klirens kreatinina, serumsku koncentraciju cistatina c, klirens inulina i I^{125} iotalamata te formule MDRD, Cockcroft Gault i Nankivell.

Klirens iotalamata najtočnije određuje razinu glomerularne filtracije, međutim metodologija za njegovu primjenu nije široko rasprostranjena u kliničkoj praksi [13]. Njegovo određivanje zahtjeva veću suradljivost bolesnika i donosi veće troškove. Ovi nedostaci nažalost prevažu u odnosu na prednosti (rane identifikacije malih promjena GFR) pa su stoga određivanje klirensa kreatinina kao i procjena bubrežne funkcije pomoću formula danas dominantne metode u kliničkoj praksi i kliničkim studijama.

Vrijednosti pojedinih formula procjene bubrežne funkcije u transplantiranoj populaciji evaluirali su Gonwa i suradnici u studiji na 1447 kandidata prije i poslije transplantacije jetre. GFR određena klirensom I^{125} iotalamata kao „zlatni standardom“ uspoređivana je s tri formule procjene GFR koje se baziraju na kreatininu u serumu; MDRD, Cockcroft Gault i Nankivell formulom. Najpreciznijom pokazala se MDRD formula, iako je podcjenjivala vrijednosti bubrežne funkcije unutar prve godine nakon TJ [13].

Zlatni standard u postavljanju dijagnoze bubrežnih bolesti je patohistološka analiza tkiva bubrega dobivenog biopsijom. Biopsijom bubrega analiziraju se promjene kapilara, tubula i intersticija čime se dobivaju informacije o opsegu i kroničnosti promjena (reverzibilnosti/ireverzibilnosti) te etiologiji. Biopsija bubrega, iako su komplikacije rijetke, invazivni je zahvat povezan najčešće s prolaznom postproceduralnom boli i krvarenjem te znatno rjeđe s infekcijama, razvojem arterijsko-venskih fistula i mortalitetom koji iznosi 0.02-0.1%.

1.4 Faktori koji utječu na razvitak bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre

U etiologiju razvoja kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre uključeni su multipli faktori rizika koji sugeriraju složenost i multifaktorijalnost patogeneze. Oni uključuju stanje bubrežne funkcije prije transplantacije, demografske faktore, komorbiditete prije i nakon transplantacije; arterijsku hipertenziju, šećernu bolest, infekcije virusom hepatitisa C (HCV), perioperativne incidente, razvoj akutnog bubrežnog zatajenja nakon transplantacije, te osobito imunosupresivne lijekove - kalcineurinske inhibitore: ciklosporin i takrolimus [16, 17, 18]. CNI danas čine osnovu imunosupresijskih protokola kod većine transplantacija solidnih organa. U razvoju bubrežne bolesti CNI imaju centralnu ulogu radi svoje nefrotoksičnosti koju ostvaruju direktnim učinkom, ali i povećanjem rizika za razvitak metaboličkog sindroma i šećerne bolesti [19, 20].

1.4.1 Bubrežna funkcija prije transplantacije jetre

Bubrežna funkcija prije transplantacije jetre važan je faktor koji doprinosi razvoju KBB nakon TJ. Procjena bubrežne funkcije metodama koje se oslanjaju na vrijednosti kreatinina u serumu često dovodi po precijenjene bubrežne funkcije bolesnika prije TJ. Razlog tome su mala mišićna masa, slabiji prehrambeni status, gubitak na težini uslijed kronične bolesti, razvoj edema i ascitesa koji u pravilu čine kliničku sliku bolesnika s terminalnom bolesti jetre. Kod kandidata za TJ bubrežna funkcija nerijetko je ugrožena smanjenim efektivnim cirkulirajućim volumenom krvi kao posljedicom splanhničke vazodilatacije u sklopu hepatorenalnog sindroma.

Ulogu biopsije bubrega u procjeni uzroka i težine bolesti bubrega prije TJ nije moguće adekvatno evaulirati. Kod bolesnika sa terminalnom bolesti jetre oštećenje bubrežne funkcije

djelomično je posredovano hemodinamskim promjenama pa stoga biopsija ima ograničavajuću dijagnostičku vrijednost. Biopsija bubrega u bolesnika s cirozom jetre povezana je s povećanim rizikom od komplikacija zbog trombocitopenije, koagulopatije, hemodinamske nestabilnosti ili otežanog pristupa [21]. Usprkos ovim nedostacima i mogućim komplikacijama, biopsija bubrega predstavlja zlatni standard za postavljanje dijagnoze nejasne bubrežne bolesti u bolesnika s bolešću jetre.

Značaj identifikacije bubrežne disfunkcije prije TJ leži u činjenici da ona predstavlja važan faktor rizika za slabije preživljenje nakon TJ [14].

1.4.2 Demografski faktori i komorbiditeti

Osnovni demografski parametri kao i komorbiditet transplantacijskih kandidata pridonose riziku za razvoj KBB nakon TJ. Nekoliko studija pokazalo je da viša životna dob i ženski spol predstavljaju povećani rizik za razvoj KBB [1, 22].

Šećerna bolest i hipertenzija povećavaju rizik od razvitka KBB nakon TJ. Preegzistentna bubrežna bolest uzrokovana jednim od navedenih etioloških faktora može biti maskirana u populaciji transplantacijskih kandidata ukoliko se koristi kreatinin u serumu kao marker procjene bubrežne funkcije [1, 22].

Infekcija virusom hepatitisa C prepoznata je kao važan faktor rizika za razvoj KBB nakon transplantacije. Rizik razvitka KBB predominantno je posljedica glomerulonefritisa (GN) [8, 23, 24]. U studiji provedenoj na 30 bolesnika sa HCV cirozom, McGuire i suradnici dokazali su na više od 80% biopsija bubrega glomerulonefritis posredovan imunim kompleksima, a najzastupljeniji je bio membranoproliferativni GN tip 1, zatim IgA nefropatija i mesangijalni GN [23]. Također su Kim JY i suradnici na populaciji predominantno transplantiranih HCV pozitivnih bolesnika, prikazali da su za razvitak KBB u 42% slučajeva odgovorne primarne bolesti glomerula [8].

1.4.3 Perioperativni faktori

Akutno oštećenje bubrega u peritransplantacijskom periodu predstavlja dodatni rizik za razvitak KBB nakon TJ. Tijekom operativnog zahvata hipotenzija, hipoperfuzija, primjena

nefrotoksičnih lijekova, septična stanja kao i forsirana diureza mehanizmi su kojima nastupa akutno oštećenje bubrega [18]. Perioperativni faktori koji sudjeluju u razvitku akutnog bubrežnog oštećenja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Faktori rizika za razvitak akutnog bubrežnog oštećenja.

Predtransplantacijski faktori	Intraoperativni faktori	Posttransplantacijski faktori
bubrežna disfunkcija	hemodinamska nestabilnost	post-reperfuzijski sindrom
hepatorenalni sindrom	krvarenje	akutna tubularna nekroza
hiperbilirubinemija	kirurška tehnika	odgođena funkcija grafta
hipoproteinemija	volumen krvnih derivata	vazoprespresorna terapija
hiponatrijemija		volumen krvnih derivata
APACHE* II bodovni sustav		relaparotomije
		bakterijske infekcije
		polifarmakoterapija
		CNI imunosupresija

*APACHE – eng. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

Potreba za akutnim nadomjesnim bubrežnim liječenjem u perioperativnom periodu rezultira lošijim ishodom bubrega kao i lošijim preživljenjem bolesnika [25].

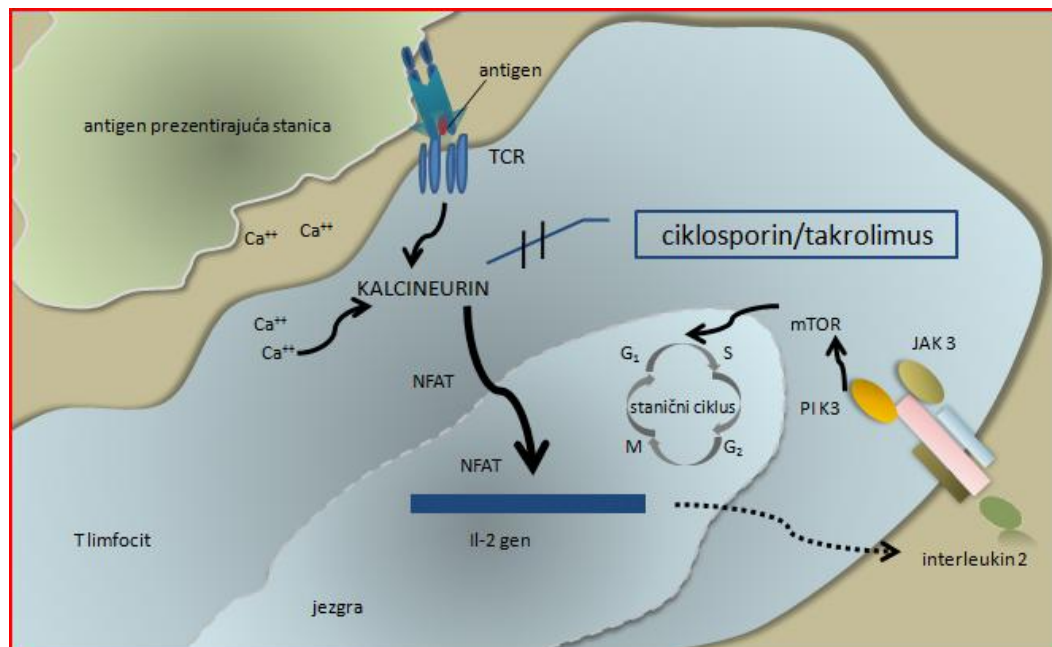
1.4.4 Kalcineurinski inhibitori

Od lijekova koji utječu na razvoj KBB nakon transplantacije jetre najvažniji su kalcineurinski inhibitori koji čine većinu imunosupresivnih protokola.

Ciklosporin i takrolimus imunosupresivno djelovanje ostvaraju formiranjem kompleksa sa citoplazmatskim proteinima, čime dolazi do inhibicije proteina fosfataze kalcineurina. Ciklosporin se veže za ciklofilin, a takrolimus za FK506-vežući protein 12 (eng, FK-binding protein 12, FKBP12).

Supstrat kalcineurina je nuklearni faktor aktiviranih T-stanica (NFAT) kojim se regulira transkripcija interleukina 2 (IL-2). U stimuliranim T limfocitima, utok iona kalcija aktivira kalcineurin koji dovodi do defosforilacije NFAT, koji ulazi u jezgu i započinje transkripciju IL-2 [26]. IL-2 signalima putem Janus kinaze 3 (JAK3), fosfoinozimid-3 kinaze (PI-3K) i mTOR-a započinje stanični ciklus tj.

proliferaciju T-limfocita. Inhibicijom kalcineurina sprečava se transkripcija gena za citokine, osobito IL-2, te proliferacija T-limfocita što je osnova njihovog imunosupresivnog djelovanja [27] (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz djelovanja kalcineurinskih inhibitora. Kompleks CNI sa citoplazmatskim proteinima inhibira kalcineurin i dovodi do smanjene proliferacije T-limfocita.

Ciklosporin (CsA)

Ciklosporin je otkriven 1970. godine iz uzorka tla u Norveškoj izolatom ciklopeptida gljivice *Tolypocladium inflatum*. Testiranje ciklopeptida pokazalo je slabo antifungalno, ali do tada jedinstveno imunosupresivno djelovanje uz nisku citotoksičnu aktivnost. [28]. Prva klinička iskustva sa CsA dala su povoljne rezultate, ali i ukazala na neželjena djelovanja [29]. Toksičnost ciklosporina manifestira se neurološkim poremećajima, hiperkalemijom, hipomagnezijom, hiperlipidemijom, gingivalnom hiperplazijom, hirsutizmom, hipertenzijom te bubrežnom disfunkcijom [29, 30, 31, 32].

Američka skupina predvođena Starzlom prva je redukcijom doze i kombinacijom sa prednisolonom smanjila toksičnost ciklosporina što je ujedno i postala osnova imunosupresivnih protokola [33].

Takrolimus (Tac)

Takrolimus je otkriven 1984. godine iz uzorka tla u Japanu, izolacijom makrolidnog metabolita (cikličkog 11-lanačanog polipetida) bakterije *Streptomyces tscubaensis*. Iako po strukturi drugačiji od ciklosporina, oni dijele zajednička biološka svojstva specifične inhibicije T-limfocita. Kliničke studije započele su 1988. godine u Americi, predvođene Starzlom [34], a 1994 godine odobrena je primjena takrolimusa kod transplantacije jetre.

Takrolimus u odnosu na ciklosporin ima izraženije neurološke nuspojave, veću incidenciju šećerne bolesti, češće gastrointestinalne simptome te češće uzrokuje alopeciju. Hirzutizam, gingivalna hiperplazija i hipertenzija su manje izraženi nego nakon primjene ciklosporina [32, 35]. Manja nefrotoksičnost takrolimusa u odnosu na ciklosporin je još uvijek kontraverzna, a kao podloga tome razmatra se moguća smanjena vazokonstrikcija uz takrolimus i manja fibrogeneza kao posljedica smanjene ekspresije TGF- β [35, 36, 37, 38].

Mehanizmi nefrotoksičnost kalcineurinskih inhibitora

Najviše eksperimentalnih podataka dobiveno je studijama sa ciklosporinom, iako takrolimus pokazuje iste patofiziološke mehanizme. Akutne promjene uzrokovane kalcineurinskim inhibitorima su uglavnom funkcionalne i reverzibilne, dok su kronične promjene strukturalne i povezane s karakterističnim histološkim promjenama [12, 17, 39, 40, 41].

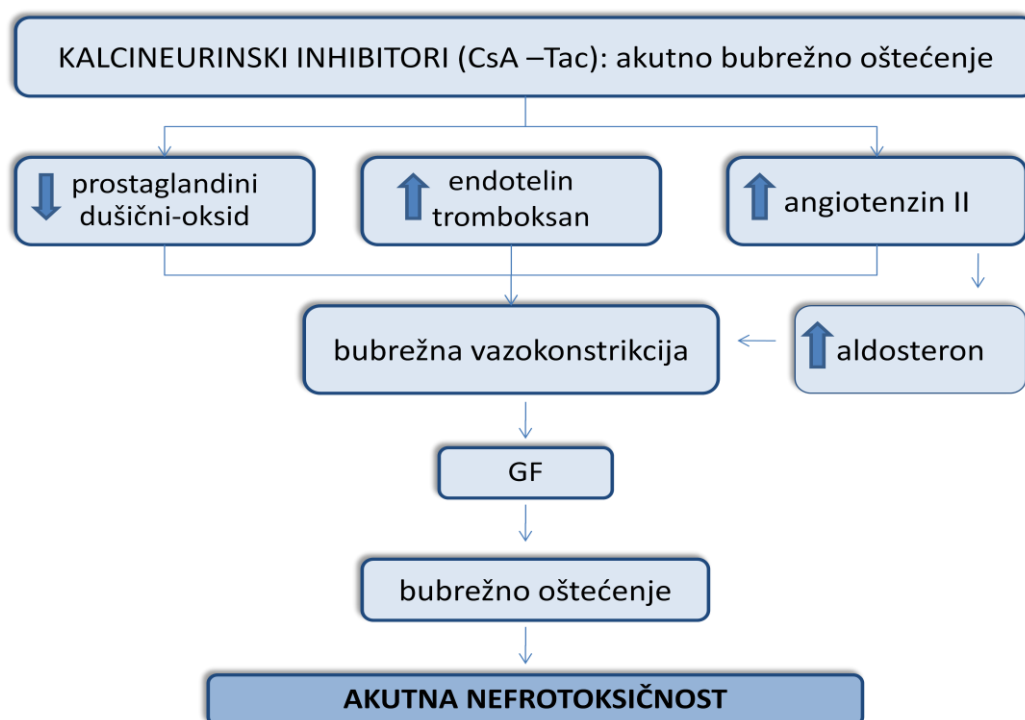
Akutna nefrotoksičnost CNI

Kalcineurinski inhibitori uzrokuju vazokonstrikciju aferentne i eferentne arteriole glomerula, čime dolazi do smanjenja bubrežnog protoka i glomerularne filtracije [39]. Reverzibilna vazokonstrikcija najizraženija je nekoliko sati nakon vršnih vrijednosti serumskih koncentracija CNI i smanjuje se postupno kako koncentracija dostiže svoju donju vrijednost [42]. Navedne promjene su reverzibilne i ovise o koncentraciji lijeka u serumu. Najznačajni pad bubrežne funkcije kao posljedica ovakvih promjena dešava se prvih 3-6 mjeseci nakon transplantacije kao što je shematski prikazano na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz bubrežnog oštećenja nakon primjene CNI.

Točan mehanizam vazokonstrikcije nije potpuno jasan, ali istraživanja ukazuju da osnovu oštećenja čini disfunkcija endotela koja dovodi do smanjene sinteze vazodilatatornih tvari (prostaglandina i dušikovog-oksida), te pojačane produkcije vazokonstriktornih tvari (angiotenzina II i tromboksana) i pojačane aktivnosti endotelina [42, 43, 44, 45, 46, 47]. Navedeni učinak može se potencirati prisustvom drugih inhibitora autoregulacije poput inhibitora renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS) ili ne-steroidnih antiinflamatornih lijekova. Mehanizam nastanka akutnog bubrežnog oštećenja shematski je prikazan na Slici 3.

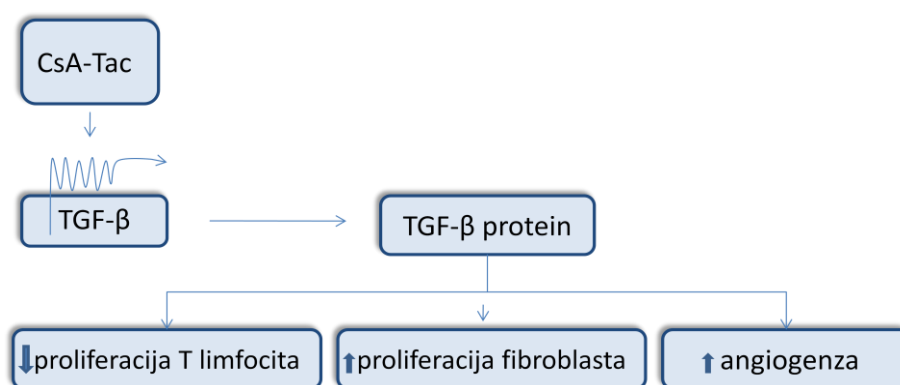


Slika 3. Mehanizam nastanka akutnog bubrežnog oštećenja uzrokovanog CNI.

Kronična nefrotoksičnost CNI

Razvoj kronične CNI nefropatije iako opsežno proučavan i dalje je nedovoljno razjašnjen [48]. Tipičnu kliničku sliku kronične CNI nefropatije karakterizira odsutnost simptoma, uredan sediment urina uz postupno smanjivanje bubrežne funkcije. Proteinurija može biti prisutna, iako je proteinurija nefrotskog razmjera rijetka i tada najčešće upućuje na neki od drugih uzroka bubrežne bolesti [46]. Studije koje su se bavile problematikom hemodinamike bubrega bolesnika liječenih ciklosporinom pokazale su da je smanjenje GFR povezano s smanjenim bubrežnim protokom, povišenim srednjim arterijskim tlakom, povećanom vaskularnom rezistencijom i pojačanim izlučivanjem albumina [12]. S vremenom navedene promjene rezultiraju progresijom arteriolopatije i ishemijskim kolapsom glomerula. U preostalim, nezahvaćenim nefronima može doći do oštećenja uzrokovanog hiperfiltracijom sa posljedičnim razvitkom terminalne bolesti bubrega. Kao odraz razvijaju se histopatološke promjene u obliku prugaste intersticijske fibroze (eng. *striped*), nodularne hijalinoze arteriola i obliterirajuće arteriolopatije, vakuolizacije tubula, te kasnije promjene u obliku tubularne atrofije, ishemijskog kolapsa glomerula i razvitka globalne i fokalne glomeruloskleroze [6, 12, 40].

Za razvitak kronične CNI nefropatije predloženo je nekoliko mehanizama nastanka. Direktni mehanizam uključuje učinak reaktivnih kisikovih čestica (eng. *reactive oxygen species*, ROS) odnosno oksidativnog stresa koji dovodi do sistemne upale sa štetnim učinkom na endotelnu funkciju [37, 44, 49]. Smatra se da osobito ciklosporin može pojačati aktivnost gena koji su odgovorni za bubrežnu fibrogenezu. Od citokina odgovornih za fibrogenezu najvažniji su transformirajući faktor rasta beta-1 (eng. *transforming growth factor beta-1*, TGF- β), matriks metaloproteinaza-9 i trombocitni faktor rasta (eng. *platelet-derived growth factor*, PDGF) [38, 50, 51]. TGF- β blokira proliferaciju T-limfocita te istovremeno potiče angiogenezu i proliferaciju fibroblasta što dovodi do razvoja fibroze (Slika 4) [52].



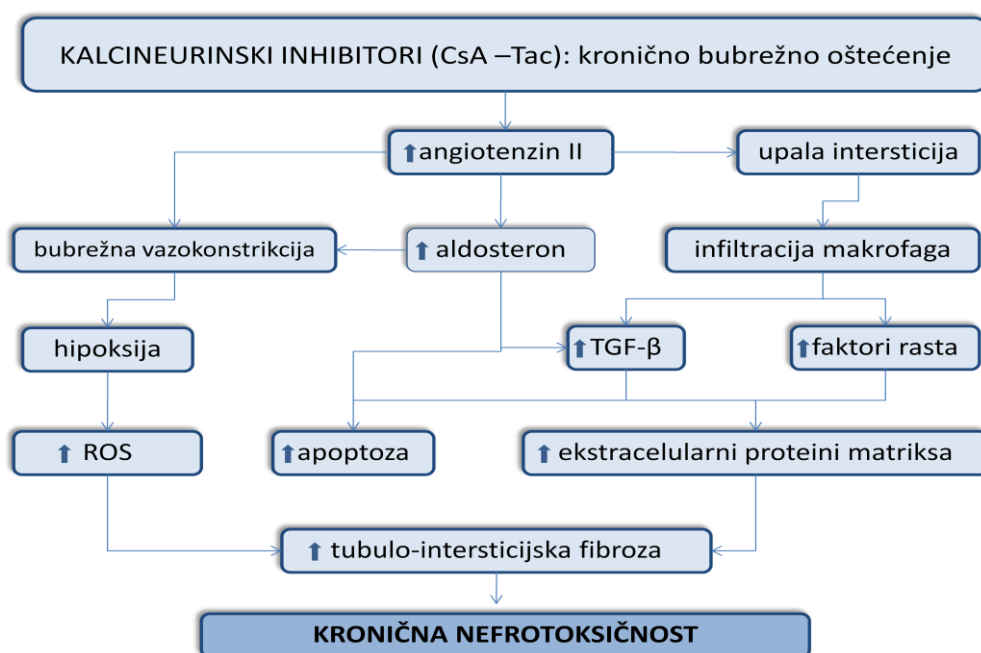
Slika 4 Uloga TGF- β u razvitku kroničnog bubrežnog oštećenja.

U nastanku CNI nefropatije patološku ulogu ima i disregulacija RAAS-a, budući da ciklosporin potiče transkripciju receptora za angiotenzin II [53]. Gallon i suradnici su pokazali kod bolesnika nakon TJ, da je D/D fenotip gena za angiotenzin konvertirajući enzim povezan s povećanim rizikom za razvitak CNI nefropatije [54].

CNI mogu uzrokovati trombotsku mikroangiopatiju (TMA) sa različitim kliničkim spektrom prezentacije, uključujući i oštećenje bubrežne funkcije. Neprepoznata kronična TMA jedan je od predloženih mehanizama nastanka razvitka kronične CNI nefropatije [6, 55].

Potencijalni indirektni mehanizmi razvitka kronične CNI nefropatije uključuju razvitak metaboličkog sindroma, hipertenziju i pojačano zadržavanje natrija u organizmu (češće uz ciklosporin) [56], šećernu bolest (češću uz takrolimus) [57, 58, 59], te dislipidemiju (češću uz ciklosporin) [60].

Mehanizam nastanka kroničnog bubrežnog oštećenja nakon primjene kalcineurinskih inhibitora prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Mehanizam nastanka kroničnog bubrežnog oštećenja nakon primjene kalcineurinskih inhibitora. Bubrežna vazokonstrikcija i istovremeni upalni odgovor dva su osnovna mehanizma koja putem glavnih medijatora kao što su TGF- β (eng. transforming growth factor beta-1) i ROS (eng. reactive oxygen species, ROS) dovode do razvoja tubulointersticijske fibroze.

1.5 Prevencija oštećenja bubrežne funkcije nakon TJ

Prevencija gubitka bubrežne funkcije treba uključivati pažljivu evaluaciju ranije navedenih preoperativnih, intraoperativnih i postoperativnih čimbenika. U slučaju prisutnosti bubrežnog oštećenja prije transplantacije potrebno je identificirati i ukoliko je moguće minimalizirati glavne patološke uzroke bubrežnog oštećenja. Isto tako tijekom operativnog zahvata nužno je osigurati dostatnu perfuziju bubrega adekvatnim izborom anestetika i operativne tehnike, te minimalizirati primjenu nefrotoksičnih lijekova. S obzirom na poznatu nefrotoksičnost CNI, koji danas čine okosnicu imunosupresivnih protokola, niža doza CNI može reducirati razvitak bubrežnog morbiditeta [19, 20, 61, 62, 63, 64]. U ranoj postoperativnoj fazi nefrotoksični učinak navedenih lijekova može biti pojačan hemodinamskom nestabilnosti uslijed operacije ili istovremenom primjenom drugih nefrotoksičnih lijekova [17, 65, 66].

U svrhu prevencije ali i liječenja preporuča se uvođenje dihidropiridinskih antagonista kalcija i lijekova koji blokiraju renin-angiotenzinski sustav (ACE inhibitori i antagonisti angiotenzin II receptora). Antagonisti kalcija svoj učinak ostvaruju redukcijom vazokonstrikcije aferentne arteriole glomerula, dok blokatori renin-angiotenzinskog sustava dodatno inhibiraju učinke angiotenzina II s posljedičnom redukcijom TGF- β i drugih profibrotičkih medijatora [67, 68, 69, 70].

U bolesnika kod kojih je KBB uzrokovana kalcineurinskom nefrotoksičnošću prvi je korak u liječenju redukcija doze kalcineurinskog inhibitora. CNI poštediti (*eng. sparing*) protokoli sastoje se od redukcije ili ukidanja CNI. Indukcijskom terapijom monoklonalnim antitijelima, dodatkom MPA ili mTOR inhibitora u imunosupresivne protokole može se reducirati nefrotoksični učinak CNI. Nekoliko studija do sada pokazalo je da je indukcijska terapija monoklonalnim antitijelima uz odgođenu primjenu CNI sigurna terapijska opcija te da povoljno djeluje na bubrežnu funkciju nakon TJ [71, 72]. Rezultati studija kombiniranom imunosupresivnom terapijom, MPA uz nisku dozu CNI, ukazuju na povoljan učinak na funkciju bubrega, a bez povećanja rizika za odbacivanjem presatka [61, 73, 74, 75, 76, 77]. Također u selekcioniranih bolesnika ukidanje CNI i zamjena sa mikofenolnom kiselinom sigurna je terapija, povezana sa boljom bubrežnom funkcijom [19, 78, 79, 80]. Učinak mTOR inhibitora na bubrežnu funkciju intenzivno se ispituje unazad nekoliko godina. Većina studija sa učinkom sirolimusa na bubrežnu funkciju uključivala je bolesnike u terapiji održavanja, najčešće kod bolesnika s već razvijenom bubrežnom disfunkcijom, *de novo* ili rekurentnim tumorima ili nakon konverzije radi akutnog ili kroničnog dobacivanja [62, 63, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87], a manje je studija kod novotransplantiranih [88, 89, 90]. U literaturi postoje oprečni rezultati opsega poboljšanja bubrežne funkcije nakon prevođenja sa CNI na sirolimus [62, 63, 91, 92]. Najveća do sada prospektivna randomizirana studija s everolimusom kod bolesnika s CNI nefrotoksičnošću nakon TJ, pokazala je da everolimus s redukcijom ili prekidom CNI u odnosu na kontrolu skupinu omogućuje siguran prekid i minimalizaciju CNI, ali nedovoljno poboljšava bubrežnu funkciju [93].

Očuvanje bubrežne funkcije kao i prevencija kalcineurinske nefrotoksičnosti danas su predmetom brojnih kliničkih istraživanja na području inhibitora proliferacijskog signala kao i nadolazećih imunosupresivnih lijekova poput sotrastaurina i betalacepta [93, 94, 95, 96, 97].

S obzirom na navedeno, za očekivati je velike modifikacije na području imunosupresivne terapije, a buduće strategije mogle bi uključivati kombinaciju inhibitora proliferacijskog signala s sotrastaurinom ili belataceptom sa ciljem prezervacije presatka i očuvanja bubrežne funkcije.

2 CILJEVI RADA I HIPOTEZA

Kako u Hrvatskoj raste broj bolesnika s transplantacijom jetre tako i kronična bolest bubrega postaje sve značajniji klinički problem. KBB nakon TJ se do sada pristupalo sporadično i navedeno područje je slabo istraženo.

CILJEVI:

Osnovni ciljevi ove disertacije su:

- odrediti incidenciju KBB nakon TJ prema K/DOQI stadijima
- identificirati faktore rizika za njezin nastanak
- istražiti klinički tijek KBB nakon TJ
- odrediti etiologiju KBB nakon TJ

HIPOTEZA:

Hipoteza ovog rada jest da će kronična bolest bubrega nakon transplantacije jetre biti česta i u većine bolesnika progresivna, te da će glavni čimbenik rizika za nastanak i progresiju KBB biti nefrotoksičnost kalcineurinskog inhibitora.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

Istraživanje je provedeno u obliku retrospektivne studije u Kliničkoj bolnici Merkur na skupini od 237 konsekutivnih bolesnika u kojih je u KB Merkur izvršena TJ u razdoblju od 01.01.2005. godine do 01.01.2010. godine.

Istraživanje se provodilo s odobrenjem Etičkog povjerenstva KB Merkur i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz poštivanje etičkih načela i bioetičkih principa koji su u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije.

3.2 Protokol studije

Uključni kriteriji

- Bolesnici stariji od 18 godina
- Bolesnici bez preegzistentne bubrežne bolesti. Preegzistentna bubrežna bolest definirana je prisutnošću ranije histološki verificirane bolesti bubrega i/ili patološke proteinurije i eritrociturije i/ili povišenih vrijednosti kreatinina više od $125 \mu\text{mol/L}$, odnosno smanjenje glomerularne filtracije ispod $60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ izračunate prema MDRD formuli u trajanju dužem od 3 mjeseca prije TJ.

Isključni kriteriji

Bolesnici mlađi od 18 godina te bolesnici sa preegzistentnom bubrežnom bolesti definiranom prema ranije navedenim kriterijima.

Kod bolesnika koji su zadovoljili uključne kriterije za studiju prikupljeni su podaci o demografskim, kliničkim i laboratorijskim parametrima prije transplantacije kao i u definiranim periodima nakon TJ.

Podaci prije transplantacije obuhvaćali su:

1. dob i spol primatelja
2. krvnu grupu i Rh faktor primatelja
3. etiologiju bolesti jetre primatelja
4. predtransplantacijske pridružne bolesti (šećernu bolest i hipertenziju)
5. virusni status (HBV, HCV)
6. prisutnost maligne bolesti i njezin tip
7. vrijednosti kreatinina u serumu ($\mu\text{mol/L}$)
8. vrijednosti bilirubina u serumu ($\mu\text{mol/L}$)
9. vrijednosti internacionalnog normaliziranog omjera (*eng.* international normalized ratio - INR)
10. MELD
11. analizu urina i proteinuriju
12. potrebu za akutnim nadomjesnim bubrežnim liječenjem (ANBL) prije transplantacije
13. dob i spol donora
14. krvnu grupu i Rh faktor donora
15. HLA tipizaciju donora
16. tip transplantacije (cijela jetra, jetreni režanj, kadaverična, sa živućeg donora)
17. broj transplantacije primatelja (prva, retransplantacija)

Alokacija prilikom transplantacije jetre temeljila se prvenstveno na MELD-u i podudarnosti krvnih grupa (kod jednog bolesnika u studiji učinjena ABO inkompatibilna transplantacija). MELD bodovni sustav je sustav procjene tromjesečnog rizika od smrtnog ishoda bolesnika s cirozom jetre [98]. Izračun MELD-a za pojedinačnog kandidata bazira se na vrijednosti tri laboratorijska parametra u serumu (bilirubina, kreatinina i INR-a) prema niže navedenoj formuli:

$$\text{MELD} = 0.957 \times \log (\text{kreatinin mg/dL}) + 0.378 \times \log (\text{bilirubin mg/dL}) + 1.120 \times \log (\text{INR}) + 0.643$$

Objašnjenje formule: MELD se množi sa 10 i zaokružuje na najbliži cijeli broj. Vrijednosti MELD-a kreću se od 6 do 40. Maksimalna vrijednost MELD-a je 40, a više vrijednosti se prilagođavaju na 40 [98]. Više vrijednosti MELD-a upućuju na teže stanje bolesnika i urgentniju potrebu za transplantacijom.

Svi bolesnici u studiji nakon transplantacije imali su sličan imunosupresivni protokol koji se je inicijalno sastojao od kortikosteroida (ukinut 3 mjeseca nakon TJ), mikofenolne kiseline i kalcineurinskog inhibitora (ciklosporina ili takrolimusa). Odabir tipa kalcineurinskog inhibitora temeljio se na odluci liječnika prisutnih prilikom transplantacije.

U definiranim periodima nakon transplantacije jetre: 1. mjesec, 3. mjesec, 6. mjesec, 12. mjesec, 24. mjesec, 36. mjesec i 48. mjesec praćeni su slijedeći parametri:

1. preživljenje bolesnika
2. preživljenje presatka
3. potreba za ANBL
4. dužina trajanja ANBL
5. vrijednost kreatinina u serumu ($\mu\text{mol/L}$)
6. tip imunosupresivne terapije (ciklosporin, takrolimus, mTOR inhibitor, 1 mj. nakon TJ)
7. epizode akutnog odbacivanja jetre (histološki verificirane)

Analiza jednokratnog uzorka urina i biopsija jetre učinjeni su prema kliničkoj indikaciji.

3.3 Biokemijski parametri

Svi biokemijski parametri korišteni u studiji učinjeni su u biokemijskom laboratoriju KB Merkur, dok su svi virološki parametri određeni u serološkom i molekularnom laboratoriju Zavoda za transfuziju, Petrova, Zagreb.

3.4 HLA tipizacija

HLA tipizacija tipizacija tkiva primatelja i donora određena je u Republičkom referalnom centru za tipizaciju tkiva, Zavodu za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb.

Tipizacija za HLA klasu I (A, B) određena je serološkom metodom, standardnim limfocitotoksičnim testiranjem, dok je tipizacija za HLA klasu II (DR) učinjena molekularnom metodom baziranoj na DNA polimeraza lančanoj reakciji.

HLA kompatibilnost primatelja i donora za HLA klasu I (A i B) te HLA klasu II (DR) određena je kao općenita nepodudarnost (*eng.* mismatch) za A, B, and DR lokuse ovisno o ukupnom

broju nepodudarnosti u tri lokusa (0 do 6 nepodudarnosti). Za potrebe ove studije bolesnici su kategorizirani u skupine od 0-2 i od 3-6 nepodudarnosti. Za analizu specifičnog lokusa HLA A, B, DR određena je nepodudarnost unutar lokusa (0 do 2 nepodudarnosti).

3.5 Akutno odbacivanje jetre

Prilikom kliničke sumnje na akutno odbacivanje jetre kod bolesnika je pod kontrolom ultrazvuka učinjena biopsija presatka uz pomoć automatskog okidača sa 16 G (*eng. gauge*) iglom. Biopsijski uzorci jetre analizirani su na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur standardnom metodom bojanjem hemalaun-eozinom (HE). Odbacivanje presatka kao i stupanj odbacivanja određeni su prema međunarodnim kriterijima temeljem Banff smjernica [99].

3.6 Određivanje bubrežne funkcije

Za procjenu glomerularne filtracije (eGFR) u studiji je korištena Modification of Diet in Renal Disease Study Group (MDRD) formula koja se temelji na vrijednostima kreatinina u serumu [100].

Veličina eGFR određena je pomoću slijedeće formule:

$$eGFR \text{ (mL/min/1.73m}^2\text{)} = 32788 \times (\text{kreatinin u serumu } (\mu\text{mol/L}))^{-1.154} \times (\text{dob u godinama})^{-0.203} \\ \times (0.742 \text{ kod žena})$$

Promjena kretanja eGFR u pojedinačnim periodima nakon transplantacije u odnosu na veličinu eGFR prije transplantacije izražena je postokom promjene prema slijedećoj formuli:

$$\Delta eGFR = \frac{eGFR(m) - eGFR(pre)}{eGFR(pre)} \times 100$$

Objašnjenje formule: m - mjesec nakon TJ, pre - prije TJ.

3.7 Biopsija bubrega

Sve biopsije bubrega učinjene su na Klinici za unutarnje bolesti KB Merkur, dok je patohistološka analiza tkiva učinjena u Kliničkom zavodu za patologiju KB Dubrava.

Indikacije za biopsije postavljene su od strane nefrologa, prema definiranom kriteriju: nejasna etiologija bubrežne disfunkcije ($GF < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) ili nalaz patološke glomerulske eritrociturije i/ili proteinurije neovisno o veličini glomerulske filtracije, u trajanju od ≥ 3 mjeseca.

Prije biopsije bubrega svim bolesnicima određeno je protrombinsko vrijeme i kompletna krvna slika. Bolesnici sa razvijenom koagulopatijom i trombocitopenijom isključeni su od zahvata. Sve biopsije bubrega učinjene su pod kontrolom ultrazvuka uz pomoć automatskog okidača sa 16 G iglom pristupom uz donji pol bubrega. Nakon biopsije bolesnici su minimalno monitorirani 4 sata radi potencijalnih komplikacija, provjerom vitalnih znakova, kontrolom krvne slike i sedimenta urina.

3.8 Patohistološka analiza

Cilindri bubrežnog parenhima za patohistološku analizu stavljeni su u izotoničku fiziološku otopinu i što brže transportirani do nefropatološkog laboratorija. U laboratoriju su uzorci pod disekcijskim mikroskopom podijeljeni na 3 dijela: za svjetlosnu, imunofluorescentnu i elektronsku mikroskopiju. Uzorci za svjetlosnu mikroskopiju su fiksirani u 4% neutralnom puferiranom formaldehidu (pH 7.2-7.4), a za elektronsku mikroskopiju u 3% glutaraldehidu. Za imunofluorescentnu mikroskopiju uzorci su odmah smrznuti na -20°C i rezani, te je na njima isti ili sljedeći dan učinjena daljnja obrada s primarnim protutijelima obilježenim fluoresceinom.

Daljnja obrada uzoraka za svjetlosnu mikroskopiju provela se standardnim postupkom koji uključuje ispiranje, dehidraciju, uklapanje u parafin i sušenje. Rotacijskim mikrotomom serijski su izrezani rezovi debljine oko $4 \mu\text{m}$ koji su bojeni četirima standardnim metodama bojenja u nefropatologiji: hemalaun-eozinom (HE), PAS (*eng.* periodic acid Schiff), Massom trikromnim bojanjem i Jones bojanjem.

Kod svih uzoraka učinjena je direktna imunoflorescentna analiza koristeći protutijela (Dako) za: imunoglobulin G (IgG), imunoglobulin A (IgA), imunoglobulin M (IgM), komponentu

komplementa 3 (C3), komponentu komplementa 1q (C1q), fibrinogen, albumin te kapa (κ)- i lambda (λ)-lake lance.

U 96% uzoraka učinjena je analiza elektronskim mikroskopom. Nakon fiksacije u glutaraldehidu tkivo je kontrastirano osmijevim tetroksidom, dehidrirano i uklopljeno u sintetsku smolu (Epon) te rezano na ultramikrotomu najprije na polutanke rezove debljine 2 μm koji su bojeni toluidinom. Ukoliko je na polutankim rezovima bio prisutan glomerul učinjeni su ultratanki rezovi debljine 70-100 nm. Ovi rezovi su stavljeni na bakrene mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovnom citratom te mikroskopirani elektronskim mikroskopom JEOL 1400.

Broj segmentalno ili globalno skleroziranih glomerula određen je kao postotak od ukupnog broja glomerula viđenih u bioptičkom uzorku.

Intersticijska fibroza i tubularna atrofija (IF/TA) određeni su kao postotak zahvaćenog parenhima kore bubrega u odnosu na ukupni parenhim kore bubrega u bioptičkom uzorku. Za potrebe ovog rada IF/TA klasificirani su kao odsutna (0%), blaga (1-24%), umjerena (25-49%), teška (50-74%) i vrlo teška (75-100%).

Temeljem patohistoloških dijagnoza za potrebe studije bolesnici su svrstani u tri dijagnostičke kategorije: a) kalcineurinska nefrotoksičnost, b) hipertenzivna glomerulopatija i c) bolesti glomerula. Ukoliko je bolesnik imao više od jedne zaključene dijagnoze (3 slučaja) za klasifikaciju u dijagnostičko-terapijske skupine uzeta je dominantna patohistološka dijagnoza.

3.9 Statističke metode

Numeričke varijable testirane su na normalnost raspodjele Shapiro-Wilksovim testom.

Za testiranje razlika numeričkih varijabli (npr. dob pacijenta, kreatinin, eGFR i dr.) između grupa korišteni su parametrijski testovi (t-test i ANOVA s *post-hoc* Bonferronijevim testom) u slučaju normalne raspodjele, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele koristili su se neparametrijski testovi (Mann-Whitney U ili Kruskal-Walis test).

Numeričke varijable u radu prikazane su kao srednja vrijednost i standardna devijacija te ukoliko je bilo potrebno i raspon, ukoliko nije drugačije naznačeno.

Za usporedbu grupa prema nominalnim kategorijskim varijablama (npr. spol, krvna grupa, vrsta imunosupresivne terapije, HLA nepodudarnost i dr.) korišten je χ^2 test ili Fisher-ov egzaktni test.

Korelacije između veličine eGFR prije transplantacije i promjene eGFR nakon transplantacije testirane su metodom linearne regresije, a regresijski koeficijenti navedeni su sa 95% intervalom pouzdanosti (*eng. confidence interval CI*).

Korelacije između veličine eGFR i stupnja IF/TA testirane su ne-parametrijskim Spearman rank testom.

Kumulativna incidencija kronične bubrežne bolesti, te preživljenja presatka i transplantiranog pacijenta provedeni su pomoću Kaplan-Meierove metode. Model Coxove regresije korišten je za izračun omjera rizika (*eng. hazard ratio – HR*) i 95% intervala pouzdanosti (*eng. confidence interval-CI*) za varijable koje su utjecale na razvitak KBB. Za identifikaciju nezavisnih faktora rizika za razvitak KBB nakon TJ (eGFR<60, u trajanju dužem od 3 mjeseca) kao zavisnom varijablom, napravljena je multivarijatna analiza sa svim varijablama iz univarijatne analize koje su bile statistički značajne ($p<0,05$).

Razina statističke značajnosti za ovo istraživanje određena je na $p<0,05$.

Za obradu podataka korišten je programski paket SPSS ver. 17.01 (SPSS Inc, Chicago, IL, SAD).

4 REZULTATI

U razdoblju od siječnja 2005. do siječnja 2010. godine transplantirano je 237 bolesnika. Od toga je 27 (11,4%) bolesnika imalo preegzistentnu bubrežnu bolest.

Preegzistentna bubrežna bolest definirana je prisutnošću ranije histološki verificirane bolesti bubrega i/ili patološke proteinurije i eritrociturije i/ili povišenih vrijednosti kreatinina na više od 125 $\mu\text{mol/L}$, odnosno smanjenja glomerularne filtracije ispod 60 mL/min/1.73 m² procijenjene prema MDRD formuli u trajanju dužem od 3 mjeseca prije TJ.

Uključne kriterije studije zadovoljilo je 197 bolesnika sa 207 transplantacija jetre, budući da je 10 bolesnika bilo retransplantirano.

U 95,2% slučajeva radilo se o prvoj transplantaciji jetre, dok je manje od 5% bolesnika bilo podvrgnuto retransplantaciji jetre ($p < 0,001$). Od ukupnog broja bolesnika u studiji kod 6,8% bila je učinjena urgentna transplantacija jetre. U većine bolesnika (96,6%) transplantirana je cijela jetra s kadaveričnog donora, dok je u 6 bolesnika učinjena transplantacija lijevog režnja jetre sa živućeg donora, a u jednog bolesnika "split" transplantacija lijevog jetrenog režnja kadaveričnog donora. Tipovi operativnih zahvata ($n=207$) prema dijagnozama prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Tipovi operativnih zahvata.

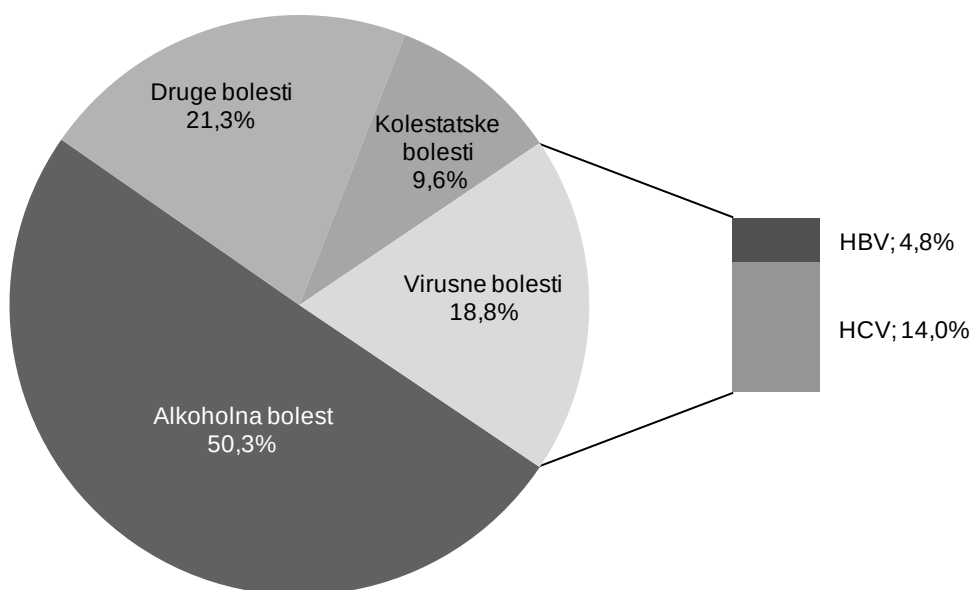
Tip zahvata	Ukupno n=207	Alkoholna bolest jetre n=99	Virusne bolesti jetre n=38	Kolestatske bolesti jetre n=19	Druge bolesti jetre n=51
prva transplantacija, n (%)	197 (95,2)	99 (100)	37 (97,4)	19 (100)	42 (82,4)
retransplantacije, n (%)	10 (4,8)	0	1 (2,7)	0	9 (17,6)
urgentne transpl., n (%)	14 (6,8)	0	1 (2,6)	0	13 (25,5)
cijela jetra, n (%)	200 (96,6)	100 (99,0)	38 (100)	18 (94,7)	46 (90,2)
jetreni režanj, n (%)	7 (3,4)	1 (1)	0	1 (5,3)	5 (9,8)

4.1 Dijagnostičke skupine bolesnika

Bolesnici (n=197) su prema indikacijama za transplantaciju temeljem bolesti jetre podijeljeni u četiri dijagnostičke skupine (Slika 6):

1. alkoholna bolest jetre (ABJ; 50,3%)
2. virusne bolesti jetre (VBJ; 18,84%) uzrokovane virusom hepatitisa C ili hepatitisa B (VBJ)
3. kolestatske bolesti jetre (KBJ, 9,6%) koje su uključivale primarni sklerozantni kolangitis, primarnu bilijarnu cirozu, sekundarnu bilijarnu cirozu
4. druge bolesti jetre (DBJ, 21,3%)

Dijagnoza drugih jetrenih bolesti predstavljala je heterogenu skupinu bolesnika koji se po dijagnozama nisu svrstali u jednu od tri prethodno navedenih dijagnoza. Tu skupinu čine bolesnici s akutnim zatajenjem jetre, kriptogenom cirozom jetre, metaboličkim bolestima jetre i primarnim ili sekundarnim tumorima jetre bez postojanja kronične parenhimne bolesti jetre.



Slika 6. Dijagnostičke skupine bolesnika.

4.2 Karakteristike bolesnika prije i nakon transplantacije jetre

Većina (69,0%) transplantiranih bolesnika bili su muškarci ($p<0,001$). Udio muškaraca bio je najveći u skupini transplantiranoj radi alkoholne bolesti jetre (u odnosu na VBJ $p<0,05$, KBJ $p<0,01$, DBJ $p<0,01$). Udio žena bio je najveći u skupini drugih jetrenih bolesti u odnosu na ostale skupine ($p<0,05$). Srednja dob bolesnika u studiji bila je $50,32\pm 11,12$ godina. Bolesnici s alkoholnom bolesti jetre bili su stariji u odnosu na bolesnike s kolestatskim bolestima jetre ($p<0,05$) i drugim bolestima jetre ($p<0,001$). Također bolesnici u skupini virusnih bolesti jetre u prosjeku su bili stariji u odnosu na skupinu s drugim bolestima jetre ($p<0,001$). Učestalost krvnih grupa u pojedinim dijagnostičkim skupinama bila je podjednaka ($p=n.s.$). Bolesnicima je transplantirana jetra prosječne starosti $47,13\pm 16,34$ godina (Tablica 4).

Tablica 4. Parametri prilikom transplantacije jetre.

Parametri	Ukupno n=197	Alkoholna bolest jetre n=99	Virusne bolesti jetre n=37	Kolestatske bolesti jetre n=19	Druge bolesti jetre n=42
Dob primatelja, god $\pm$ SD	50,32 $\pm$ 11,12	54,38 $\pm$ 7,33	52,62 $\pm$ 7,95	45,42 $\pm$ 12,64	40,93 $\pm$ 13,82
Spol, n (%)					
muški	136 (69,0)	84 (84,8)	25 (67,6)	10 (52,6)	17 (40,5)
ženski	61 (31,0)	15 (15,2)	12 (32,4)	9 (47,4)	25 (59,5)
Krvna grupa primatelja*, n (%)					
0	64 (32,5)	31 (31,3)	10 (27,0)	6 (31,6)	17 (40,5)
A	71 (36,0)	34 (34,3)	16 (43,2)	9 (47,4)	12 (28,6)
B	33 (16,8)	21 (21,2)	6 (16,2)	3 (15,8)	3 (7,1)
AB	26 (13,2)	12 (12,1)	4 (10,8)	1 (5,3)	9 (21,4)
Dob donora, god $\pm$ SD	47,13 $\pm$ 16,34	49,15 $\pm$ 15,21	48,51 $\pm$ 16,74	38,72 $\pm$ 17,83	44,95 $\pm$ 17,06

*Podaci o krvnoj grupi za 3 bolesnika su nedostajali

13,7% bolesnika prije TJ liječeno je radi šećerne bolesti, a 15,2% bolesnika radi arterijske hipertenzije, sa sličnom učestalošću navedenih pridruženih bolesti u pojedinim dijagnostičkim skupinama (Tablica 5).

Tablica 5. Pridružene bolesti prije transplantacije jetre.

Parametri	Ukupno n=197	Alkoholna bolest jetre n=99	Virusne bolesti jetre n=37	Kolestatske bolesti jetre n=19	Druge bolesti jetre n=42
Pridružene bolesti prije TJ, n (%)					
šećerna bolest	27 (13,7)	16 (16,2)	6 (16,2)	1 (5,3)	4 (9,5)
arterijska hipertenzija	30 (15,2)	20 (20,2)	5 (13,5)	1 (5,3)	4 (9,5)

Od ukupnog broja svih bolesnika njih 20,3% imalo je malignom pri transplantaciji jetre. Raspodjela tipova jetrenih malignoma bila je slijedeća: 16,2% hepatocelularni karcinom, 2,0% kolangiocelularni karcinom i 2,0% drugih tumora: metastatski adenokarcinom kolona (2 slučaja) i pseudo-papilarni karcinom gušterače (1 slučaj), te hemangioendoteliom jetre (1 slučaj). Najmanje malignoma imala je skupina s kolestatskim bolestima jetre ($p<0,001$). Najviše bolesnika s hepatocelularnim karcinomom imalo je pridruženu virusnu bolest jetre ($p<0,01$) (Tablica 6).

Tablica 6. Pridruženi malignomi prije transplantacije jetre.

Parametri	Ukupno n=197	Alkoholna bolest jetre n=99	Virusne bolesti jetre n=37	Kolestatske bolesti jetre n=19	Druge bolesti jetre n=42
Malignomi, n (%)	40 (20,3)	17 (17,2)	11 (29,7)	1 (5,3)	11 (26,1)
hepatocelularni karcinom	32 (16,2)	17 (17,2)	11 (29,7)*	1 (5,3)	3 (7,1)
kolangiocelularni karcinom	4 (2,0)	0	0	0	4 (9,5)
drugi tumori	4 (2,0)	0	0	0	4 (9,5)

Prije transplantacije prosječna eGFR iznosila je $77,66\pm31,99$ (mL/min/1.73m²). Veličina bubrežne funkcije prema eGFR nije se statistički značajno razlikovala između skupina. Prilikom transplantacije prosječan MELD iznosio je $19,32\pm7,83$. Vrijednosti bilirubina, INR-a i MELD-a kod bolesnika s alkoholom bolesti jetre bile su niže u odnosu na vrijednosti u skupini bolesnika s drugim bolestima jetre (bilirubin, $p<0,01$, INR, $p<0,05$, MELD, $p<0,05$), ali ne i u odnosu na skupine s virusnim i kolestatskim bolestima jetre. Parametri bolesnika prije transplantacije jetre prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Parametri prije transplantacije jetre.

Parametri	Svi bolesnici n=197	Alkoholna bolest jetre n=99	Virusne bolesti jetre n=37	Kolestatske bolesti jetre n=19	Druge bolesti jetre n=42
bilirubin (μmol/L)	$129,52\pm187,10$	$86,51\pm103,51$	$134,28\pm196,63$	$187,32\pm158,81$	$202,31\pm265,74$
INR	$1,78\pm1,12$	$1,63\pm0,41$	$1,88\pm1,21$	$1,40\pm0,50$	$2,19\pm1,96$
MELD±SD	$19,32\pm7,83$	$18,14\pm5,68$	$19,79\pm8,79$	$18,71\pm7,46$	$21,90\pm10,58$
kreatinin (μmol/L)	$110,73\pm68,50$	$106,07\pm52,56$	$108,76\pm59,74$	$95,16\pm61,46$	$130,97\pm102,97$
eGFR (mL/min/1.73m ²) ±SD	$77,66\pm31,99$	$75,39\pm26,86$	$77,38\pm3,87$	$90,56\pm46,46$	$77,74\pm36,79$
ANBL, n (%)	11 (5,6)	1 (1,0)	2 (5,4)	0	8 (19,0)

Laboratorijski parametri prikazani su kao srednja vrijednost±SD.

Kod 5,6% bolesnika prije transplantacije bilo je primjenjeno akutno nadomjesno bubrežno liječenje (ANBL), većinom kod bolesnika s akutnim zatajenjem jetre i akutnim oštećenjem bubrega u terminalnoj fazi bolesti jetre ($p<0,01$) (Tablica 7).

HLA podudarnost između primatelja i donora određena je u 124 slučaja. Ukupna HLA nepodudarnost u HLA-A, -B, -DR iznosila je u prosjeku $4,41\pm 1,20$. Nije bilo statistički značajne razlike između HLA nepodudarnosti i pojedinih dijagnostičkih skupina (Tablica 8).

Tablica 8. HLA nepodudarnost primatelja i donora.

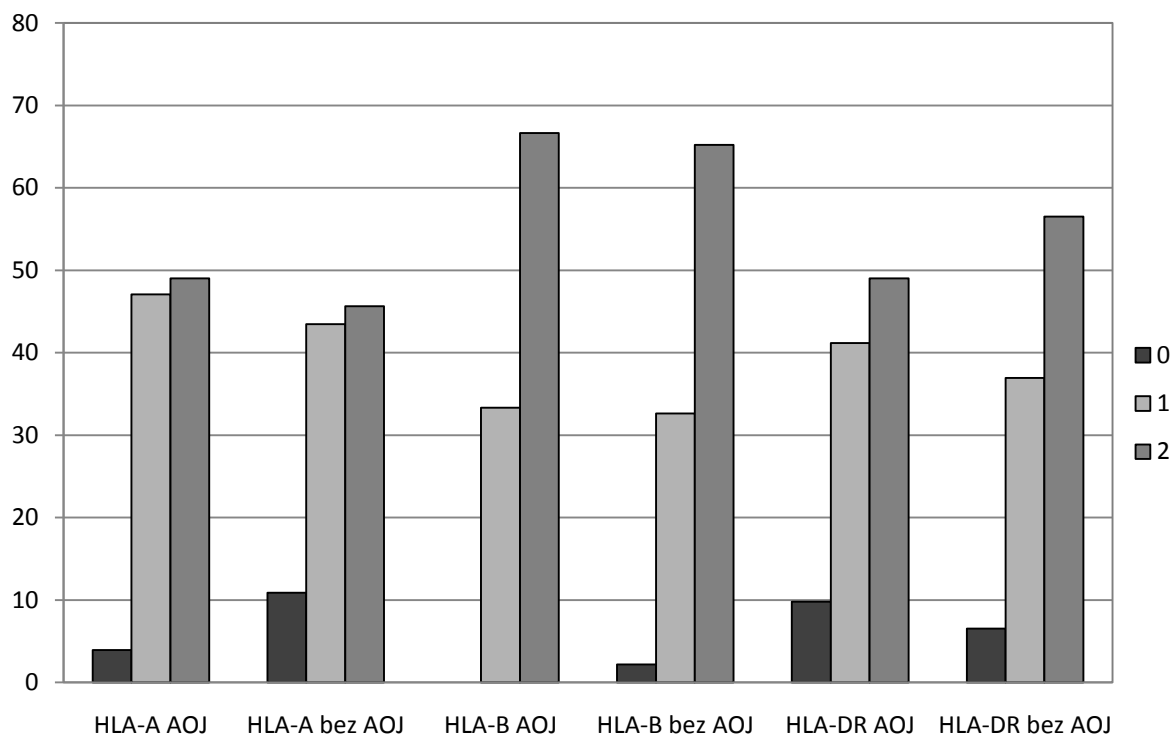
Parametri	Svi bolesnici n=124	Alkoholna bolest jetre n=60	Virusne bolesti jetre n=24	Kolestatske bolesti jetre n=14	Druge bolesti jetre n=27
HLA-A-B-DR	$4,41\pm 1,20$	$4,42\pm 1,92$	$4,54\pm 0,83$	$4,43\pm 1,28$	$4,23\pm 1,48$
HLA-A	$1,35\pm 0,64$	$1,41\pm 0,62$	$1,38\pm 0,65$	$1,14\pm 0,66$	$1,31\pm 0,68$
HLA-B	$1,62\pm 0,52$	$1,64\pm 0,52$	$1,54\pm 0,51$	$1,57\pm 0,51$	$1,65\pm 0,56$
HLA-DR	$1,44\pm 0,64$	$1,37\pm 0,67$	$1,63\pm 0,57$	$1,71\pm 0,61$	$1,27\pm 0,61$

HLA nepodudarnost prikazana je kao srednja vrijednost nepodudarnosti i standardna devijacija (SD).

U analizu povezanosti HLA nepodudarnosti i razvitka akutnog odbacivanja jetre uključeno je 90 bolesnika. Incidencija akutnog odbacivanja jetre dokazana biopsijom u prvoj godini nakon TJ bila je 33,5%.

S obzirom na ukupnu HLA-A,-B,-DR nepodudarnost nije dokazana statistički značajna razlika između skupina s 0-2 i 3-6 nepodudarnosti ($p=0,649$).

Analizom pojedinačnih epitopa HLA-A, HLA-B i HLA-DR s obzirom na 0, 1, 2 nepodudarnost i akutnog odbacivanja jetre, također nije dokazana statistički značajna razlika (HLA-A, $p=0,419$; HLA-B, $p=0,649$; HLA-DR, $p=0,71$) (Slika 7).



Slika 7. Ovisnost odbacivanja jetre (AOJ) dokazanog biopsijom i tkivne nepodudarnosti (p=n.s).

Nakon transplantacije tip imunosupresivne terapije je sa sličnom učestalošću bio primjenjen kod svih dijagnostičkih skupina (p=n.s) (Tablica 9).

Tablica 9. Imunosupresivna terapija.

Parametri	Svi bolesnici n=197	Alkoholna bolest jetre n=99	Virusne bolesti jetre n=37	Kolestatske bolesti jetre n=19	Druge bolesti jetre n=42
Imunosupresivna terapija*, n (%)					
ciklosporin	104 (52,8)	58 (58,6)	22 (59,5)	7 (36,8)	17 (40,5)
takrolimus	74 (37,6)	32 (32,3)	11 (29,7)	10 (52,6)	21 (50,0)
mTOR inhibitor	4 (2,0)	2 (2,0)	0	0	2 (4,7)
nepoznato	15 (7,6)	7 (7,1)	4 (10,8)	2 (10,5)	2 (4,7)

*Imunosupresivna terapija uključuje imunosupresivnu terapiju održavanja >1 mjeseca nakon transplantacije jetre.

Nakon transplantacije ANBL bilo je primjenjeno u 10,6% bolesnika. Više ANBL primjenjeno je kod bolesnika s drugim bolestima jetre u odnosu na alkoholnu bolest jetre ($p=0,019$), ali ne i u odnosu na druge skupine. Između ostalih skupina ANBL je primjenjeno s podjednakom učestalošću ($p=n.s.$). ANBL kod svih bolesnika primjenjeno je u prosječnom trajanju od $19,28 \pm 21,29$ dana, a između dijagnostičkih skupina s obzirom na duljinu postupka nije bilo statistički značajne razlike ($p=n.s.$) (Tablica 10).

Tablica 10. Akutno nadomjesno bubrežno liječenje (ANBL) poslije transplantacije.

Parametri	Svi bolesnici n=197	Alkoholna bolest jetre n=99	Virusne bolesti jetre n=37	Kolestatske bolesti jetre n=19	Druge bolesti jetre n=42
ANBL, n (%)	18 (9,1)	6 (6,1)	3 (8,1)	1 (5,3)	8 (19,1)
trajanje ANBL (dana $\pm$ SD)	$19,28 \pm 21,29$	$19,33 \pm 25,74$	$5,33 \pm 2,89$	36	$22,38 \pm 22,16$

4.3 Preživljenje bolesnika

Srednje vrijeme praćenja svih bolesnika u studiji bilo je $28,31 \pm 18,88$ (raspon, 0,03 do 69,73) mjeseci i nije se razlikovalo između skupina (log-rank test, $p=n.s.$).

Kumulativno preživljenje svih bolesnika u studiji iznosilo je 84,2% (12 mj), 79,9 % (24 mj.), 74,5% (36 mj.) i 72,8% (48 mj) (Slika 8).

Kumulativno preživljenje bolesnika grupiranih prema dijagnozama jetrenih bolesti prikazano je u Tablici 11 odnosno na Slici 9. Preživljenje između dijagnostičkih skupina nije se statistički razlikovalo, premda je nominalno bio najbolje u skupini kolestatskih bolesti jetre (log-rank test, $p=n.s.$).

Tablica 11. Kumulativno preživljenje bolesnika.

Dijagnoza	12 mj.	24 mj.	36 mj.	48 mj.
Alkoholna bolest	85,8%	80,8%	75,5%	75,5%
Virusne bolesti	81,1%	77,6%	61,2%	61,2%
Kolestatske bolesti	89,5%	89,5%	89,5%	89,5%
Druge bolesti	81,0%	75,3%	75,3%	69,5%

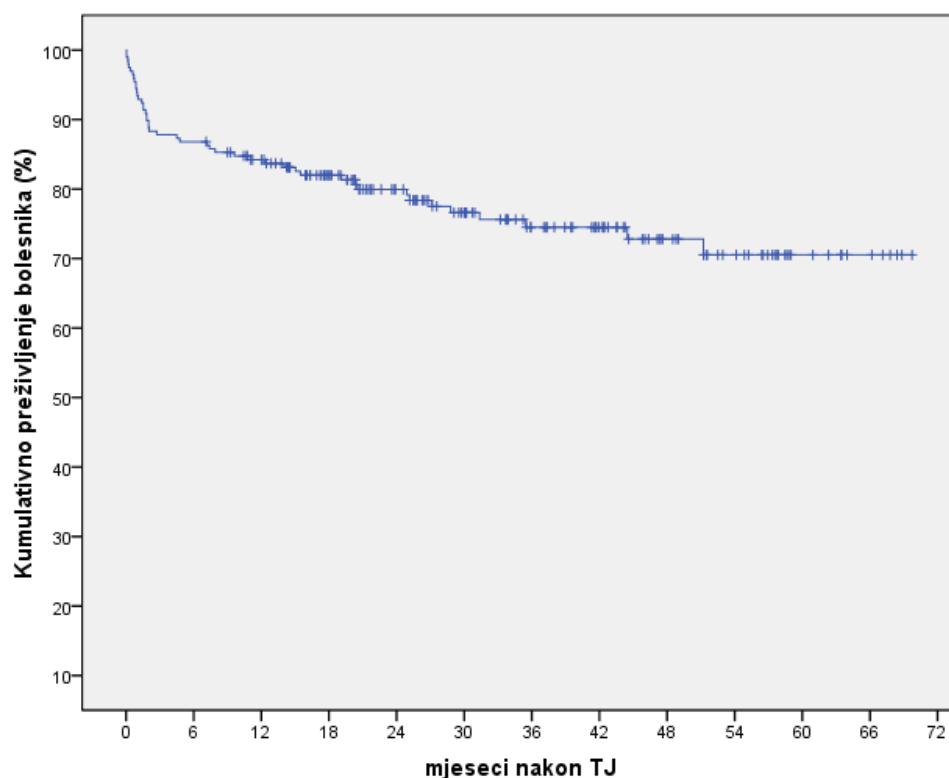
4.4 Preživljenje presadaka

Kumulativno preživljenje svih presadaka u studiji iznosilo je 79,7% (12 mj), 74,9 % (24 mj.), 69,6% (36 mj.) i 68,1% (48 mj) (Slika 10).

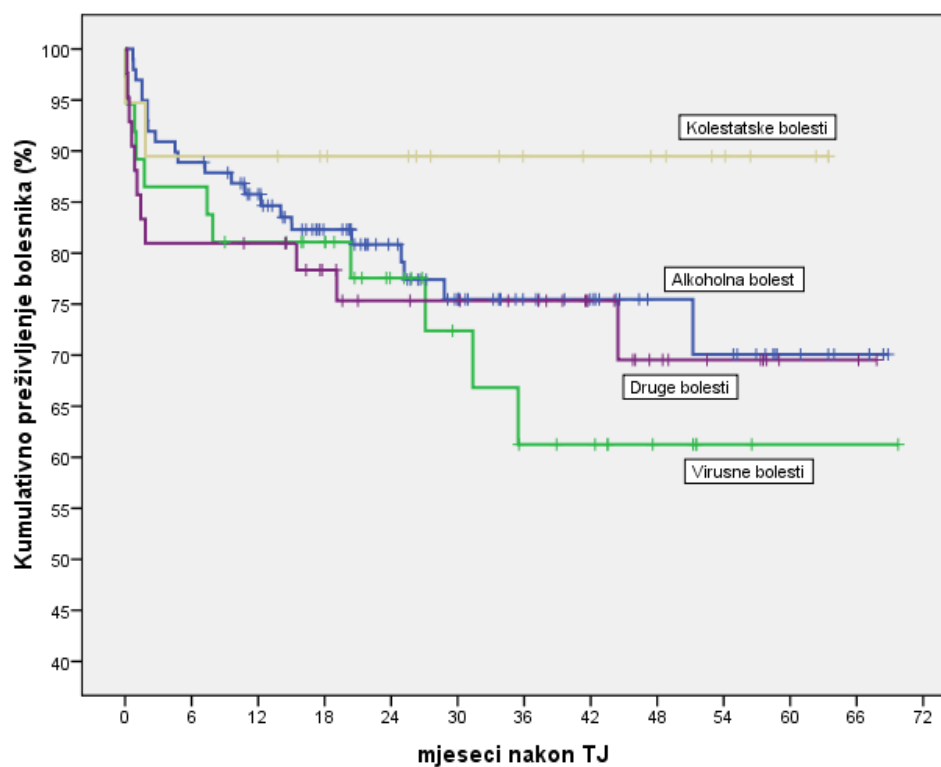
Kumulativno preživljenje grafta prema dijagnozama jetrenih bolesti prikazano je u Tablici 12 odn. na Slici 11. Preživljenje presadaka između dijagnostičkih skupina nije se statistički razlikovalo, premda je nakon 48 mj. nominalno bilo najbolje u skupini kolestatskih bolesti jetre (log-rank test, $p=n.s.$).

Tablica 12. Kumulativno preživljenje grafta.

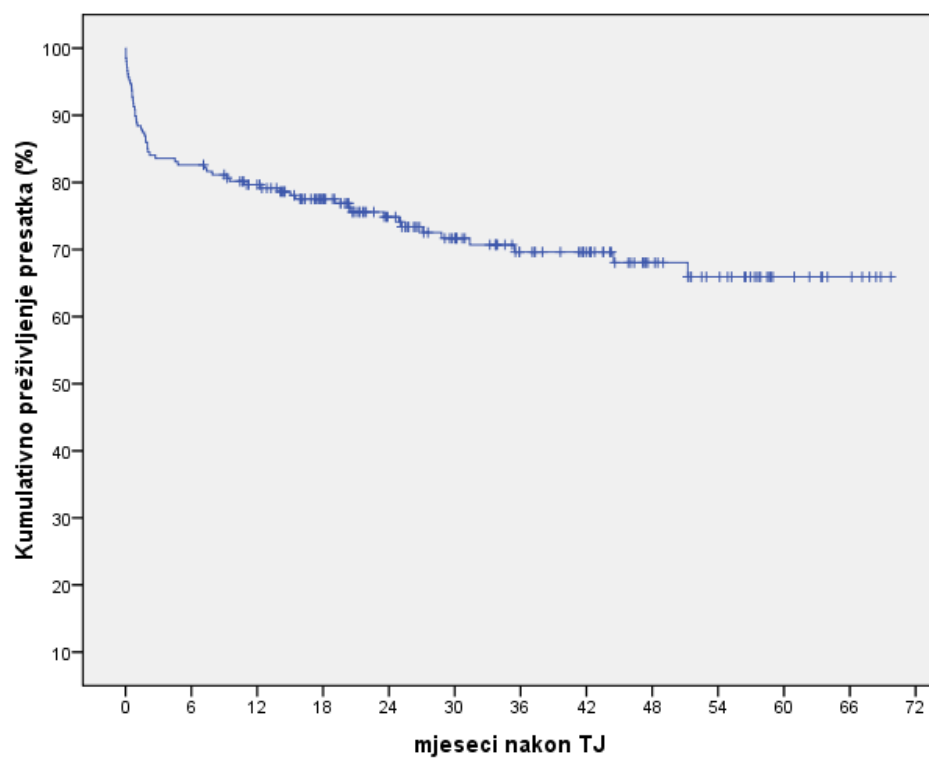
Dijagnoza	12 mj.	24 mj.	36 mj.	48 mj.
Alkoholna bolest	84,8%	79,8%	74,5%	74,5%
Virusne bolesti	81,6%	74,1%	57,4%	57,4%
Kolestatske bolesti	78,9%	78,9%	78,9%	78,9%
Druge bolesti	68,6%	64,0%	64,0%	59,4%



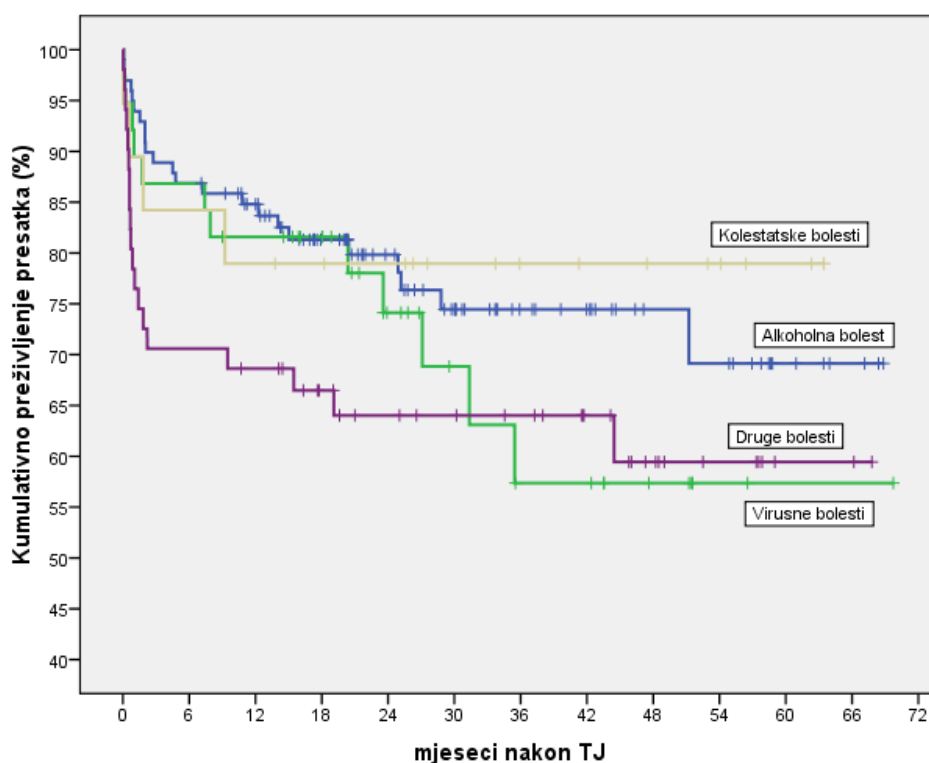
Slika 8. Kumulativno preživljenje svih bolesnika nakon transplantacije jetre (Kaplan Meier analiza preživljenja).



Slika 9. Kumulativno preživljenje bolesnika prema dijagnostičkim skupinama (Kaplan Meier analiza preživljenja).



Slika 10. Kumulativno preživljenje svih presadaka (Kaplan Meier analiza preživljenja).



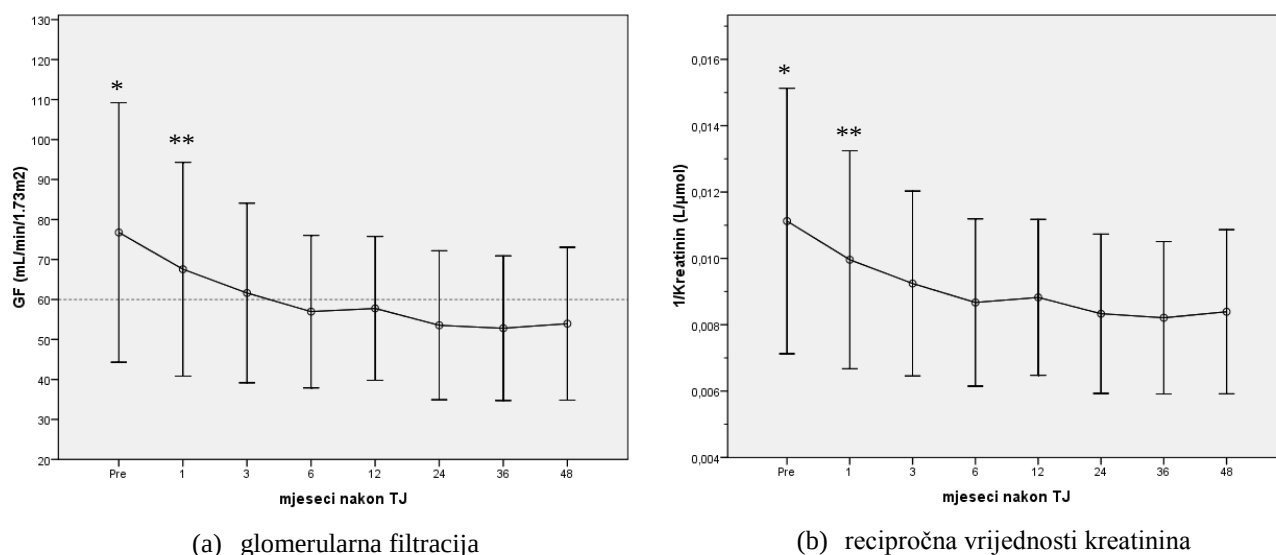
Slika 11. Kumulativno preživljenje presadaka prema dijagnostičkim skupinama (Kaplan Meier analiza preživljenja).

4.5 Bubrežna funkcija nakon transplantacije jetre

Nakon TJ došlo je do pogoršanja prosječne bubrežne funkcije.

Kretanje bubrežne funkcije nakon transplantacije prikazano je na slici 12a). Nakon transplantacije došlo je do značajnog smanjenja eGFR u odnosu na period prije transplantacije. Pad eGFR bio je najizraženiji u ranom razdoblju nakon TJ (unutar prvih 6 mjeseci). U odnosu na prije transplantacije eGFR bila je statistički niža nakon 3 mj. ($p<0,001$), 6 mj. ($p<0,001$), 12 mj. ($p<0,001$) i 36 mj ($p<0,001$).

Srednje vrijednosti eGFR u prvom mjesecu nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na vrijednosti prije transplantacije, niti u odnosu na 3 mjeseca nakon transplantacije ($p=n.s.$), ali bile su značajno više u odnosu na vrijednosti eGFR od 6-36 mjeseca (1 mj vs 6 mj $p<0,001$; 1 mj vs. 12 mj, $p<0,05$, 1 mj. vs 24 mj., $p<0,001$, 1 mj vs 36 mj., $p<0,001$). Nakon 3. mjeseca uslijedila je stabilizacija bubrežne funkcije u konstantan postupni pad do kraja praćenja kada je eGFR iznosila $53,95\pm 19,11$ mL/min/1.73 m² (prema 3 mj. $p=n.s.$).

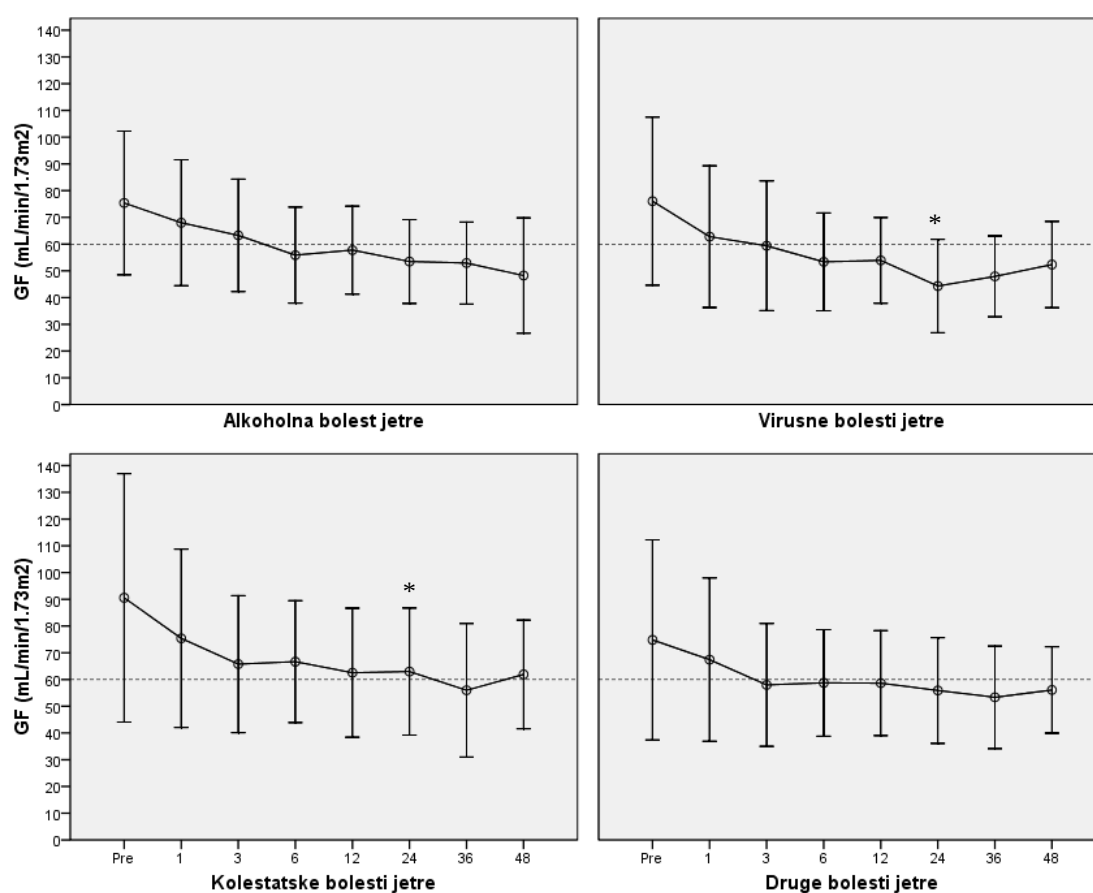


Slika 12. a) Veličina glomerularne filtracije eGFR (mL/min/1.73m²) i b) recipročna vrijednost kreatinina (1/K) u serumu (L/μmol) kod svih bolesnika u studiji.

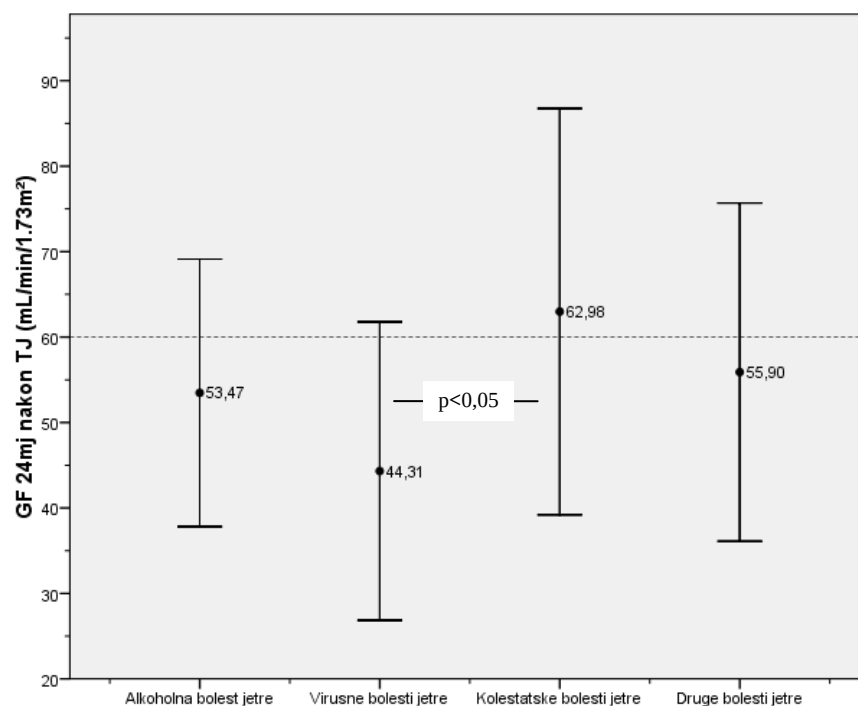
*statistički značajno više eGFR i 1/K prije TJ u odnosu na vrijednosti od 3-36. mjeseca nakon TJ; **statistički značajno više eGFR i 1/K u 3. mjesecu u odnosu na 6-36. mj. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti $\pm$ SD.

Analogno kretanju eGFR nakon transplantacije dolazi do porasta kreatinina što je prikazano na slici 12b) kao recipročna vrijednost koncentracije kreatinina u $\text{L}/\mu\text{mol}$ u pojedinim razdobljima nakon TJ.

Veličina srednje vrijednosti eGFR nije pokazala statističku povezanost među pojedinačnim dijagnostičkim skupinama za periode 1 mj.; 3 mj.; 6 mj.; 12 mj., 36 mj i 48 mj ($p=n.s.$). U 24. mjesecu nakon transplantacije bolesnici s kolestatskim bolestima imali su bolju bubrežnu funkciju u odnosu na bolesnike s virusnim bolestima ($p<0,05$) (Slike 13 i 14).



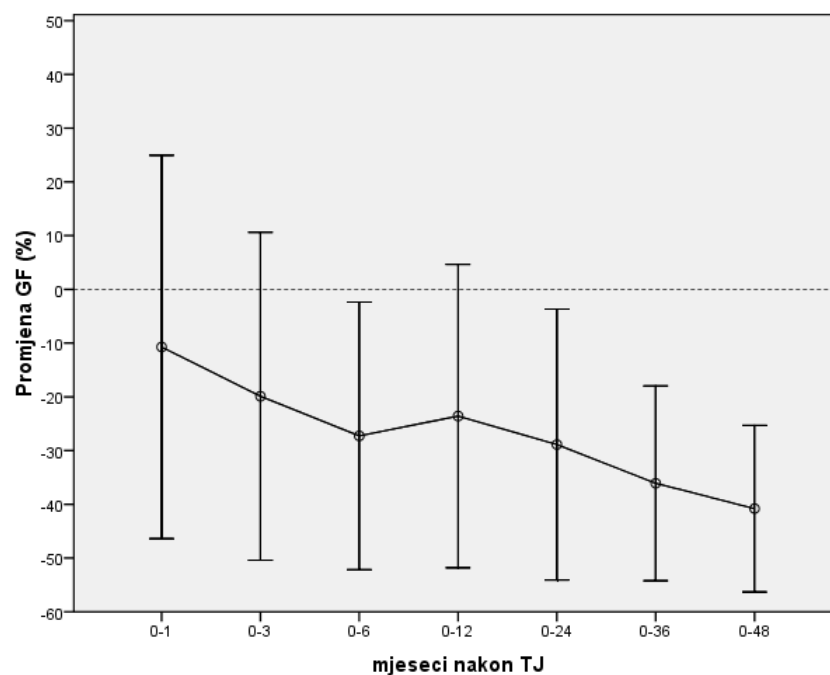
Slika 13. Srednja vrijednost eGFR ($\text{mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$) prema MDRD formuli prije i poslije transplantacije jetre kod bolesnika prema dijagnostičkim skupinama. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti $\pm$ SD.



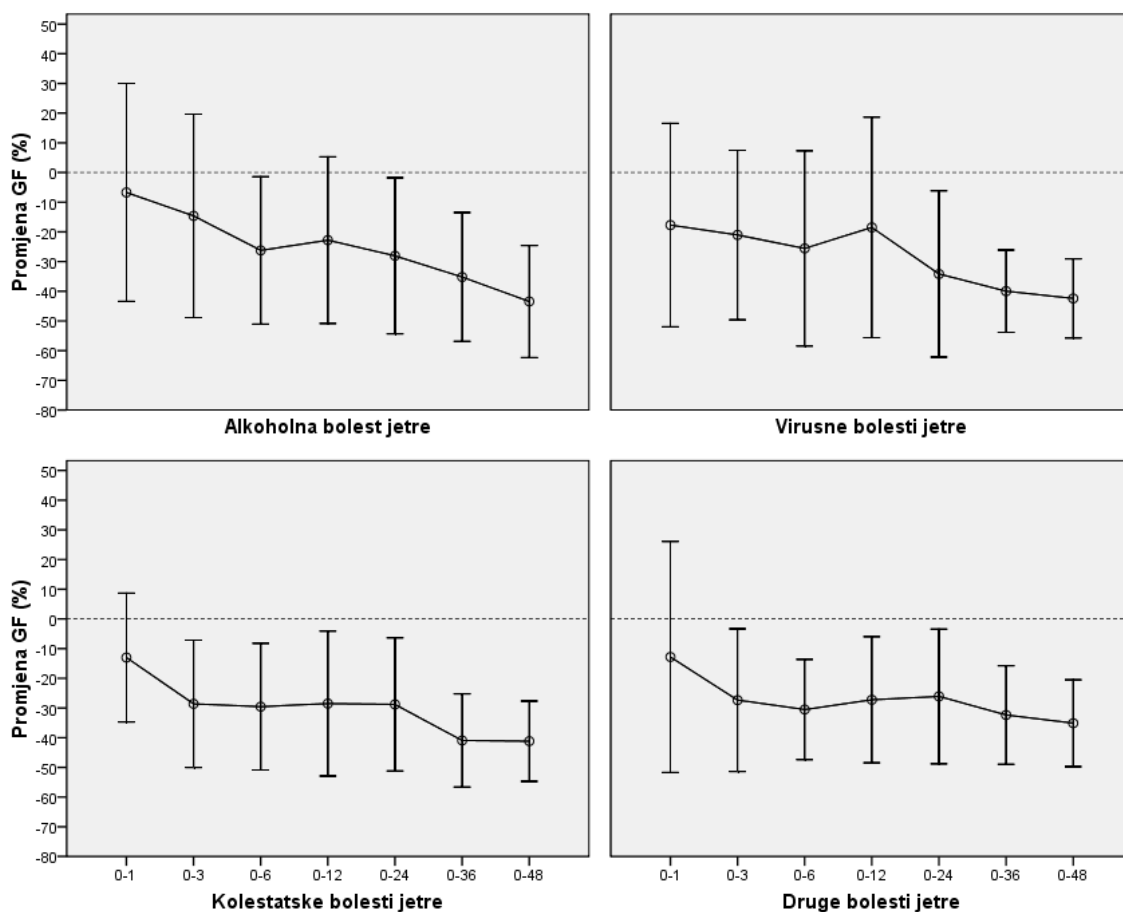
Slika 14. Srednje vrijednosti eGFR (mL/min/1.73m²) u 24 mjesecu nakon transplantacije jetre prema dijagnostičkim skupinama. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti $\pm$ SD.

Napredovanje oštećenja bubrežne funkcije najočitije je unutar 3 mjeseca nakon transplantacije jetre što je prikazano prosječnom promjenom eGFR (Δ GF) u periodima nakon transplantacije u odnosu na eGFR prije transplantacije (preTJ) (Slika 15).

Postotak promjene eGFR unutar pojedinih perioda u odnosu na dijagnostičke skupine bolesnika bio je podjednak za sve kategorije bolesnika ($p=n.s.$).



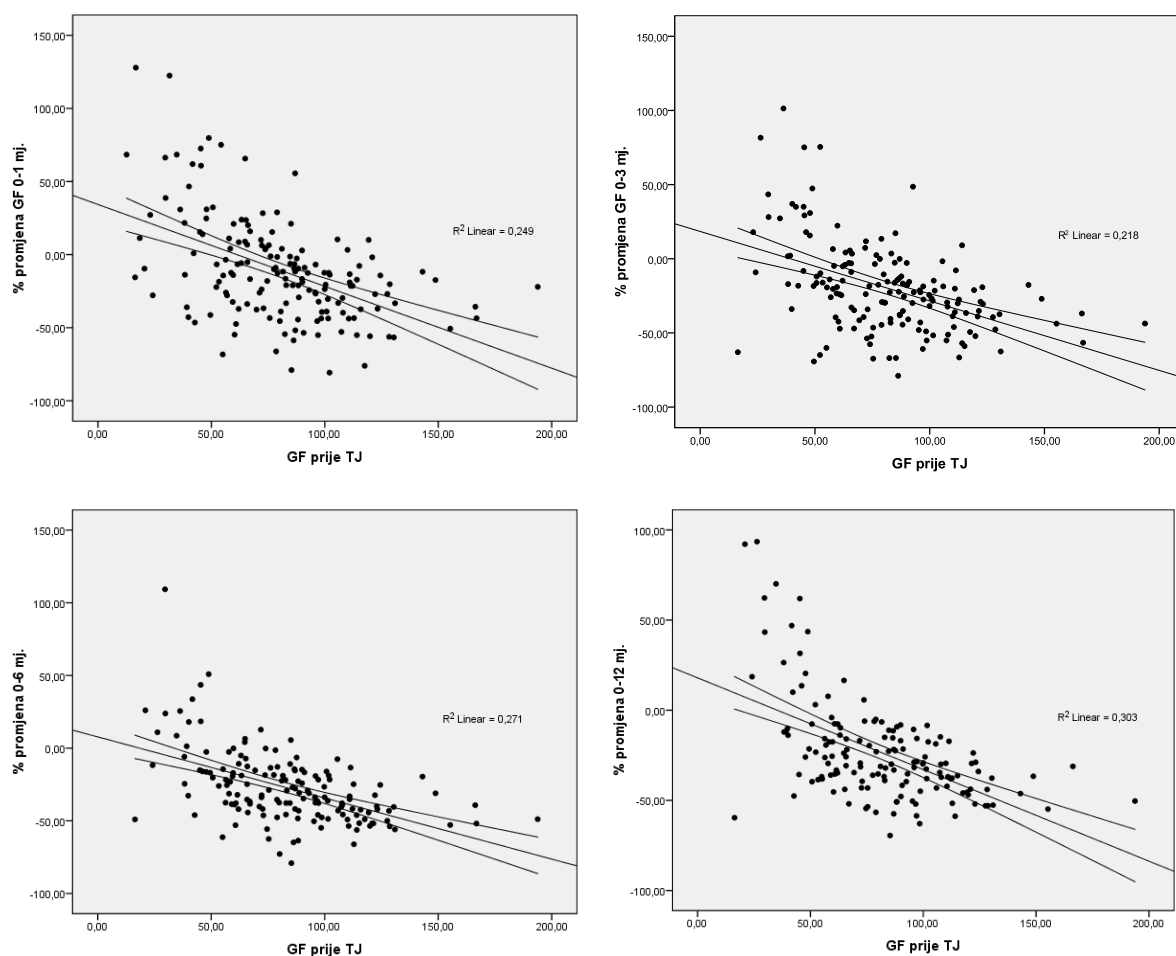
(a)



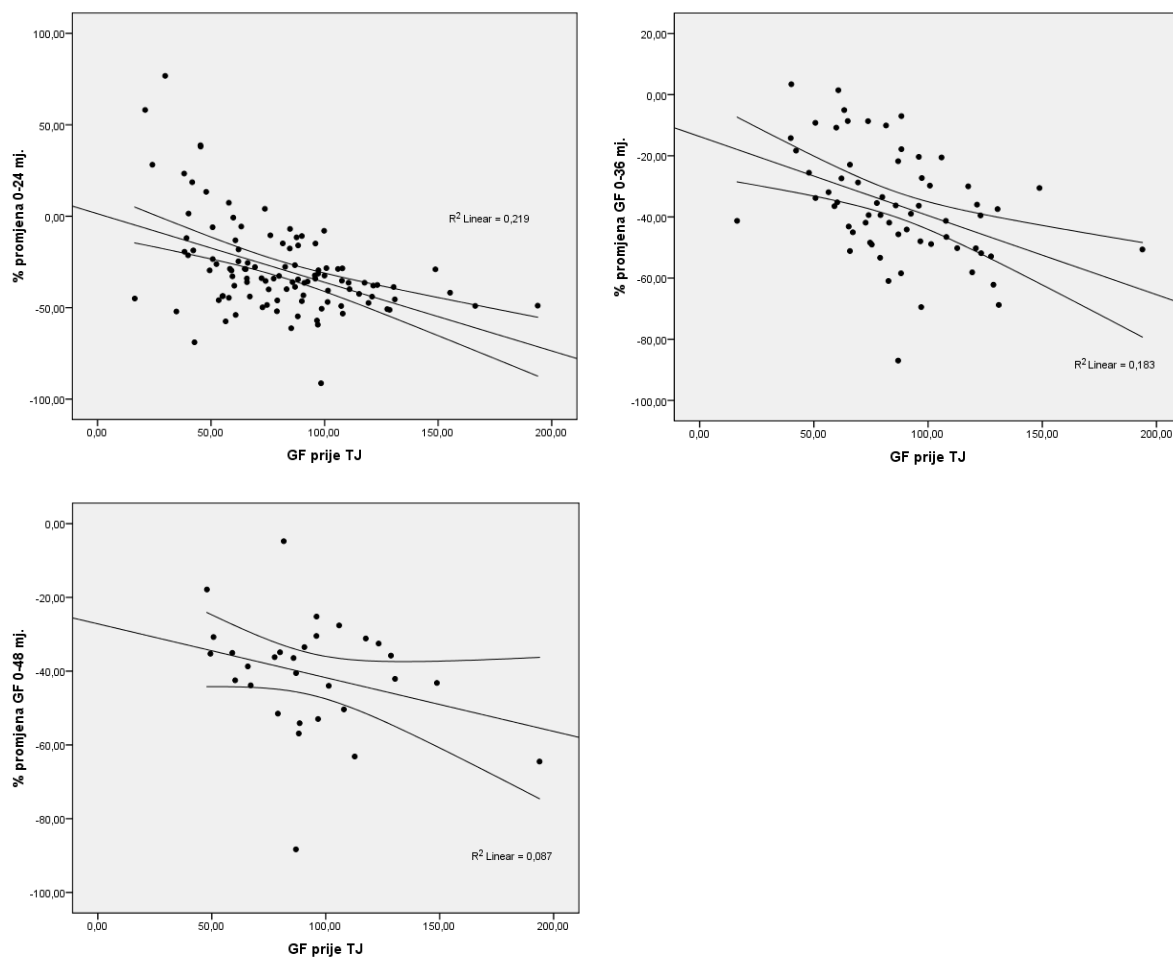
(b)

Slika 15. Kretanje promjene glomerularne filtracije u odnosu na glomerularnu filtraciju prije transplantacije u 1 - 48 mjeseci nakon transplantacije kod a) svih bolesnika i b) prema dijagnozama jetrene bolesti. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti $\pm$ SD.

Tijekom prvog mjeseca nakon transplantacije veličina pada eGFR pozitivno je korelirala s veličinom eGFR prije transplantacije, tako da su veći pad doživjeli bolesnici s boljom eGFR prije transplantacije. Statistički značajna negativna povezanost između eGFR prije transplantacije i postotka promjene nakon transplantacije utvrđena je u svim mjerenjima od 1 do 36 mjeseca. Kod bolesnika s nižim vrijednostima eGFR prije transplantacije sniženje eGFR nakon transplantacije bilo je manje izraženo, ili je dolazilo do oporavka eGFR nakon TJ. Navedeni odnosi prikazani su na Slici 16 prema mjesecima praćenja u odnosu na vrijednosti prije TJ: za 1 mjesec ($r^2=0,249$, $p<0,001$) za 3 mjesec ($r^2=0,218$, $p<0,001$) za 6 mjesec ($r^2=0,271$, $p<0,001$) za 12 mjesec ($r^2=0,303$, $p<0,001$) za 24 mjesec ($r^2=0,219$, $p<0,001$) za 36 mjesec ($r^2=0,183$, $p<0,001$). Za promjenu eGFR u 48 mjesecu odnosu na vrijednosti eGFR prije transplantacije ($r^2=0,087$, $p=0,11$) nije utvrđena statistički značajna povezanost.

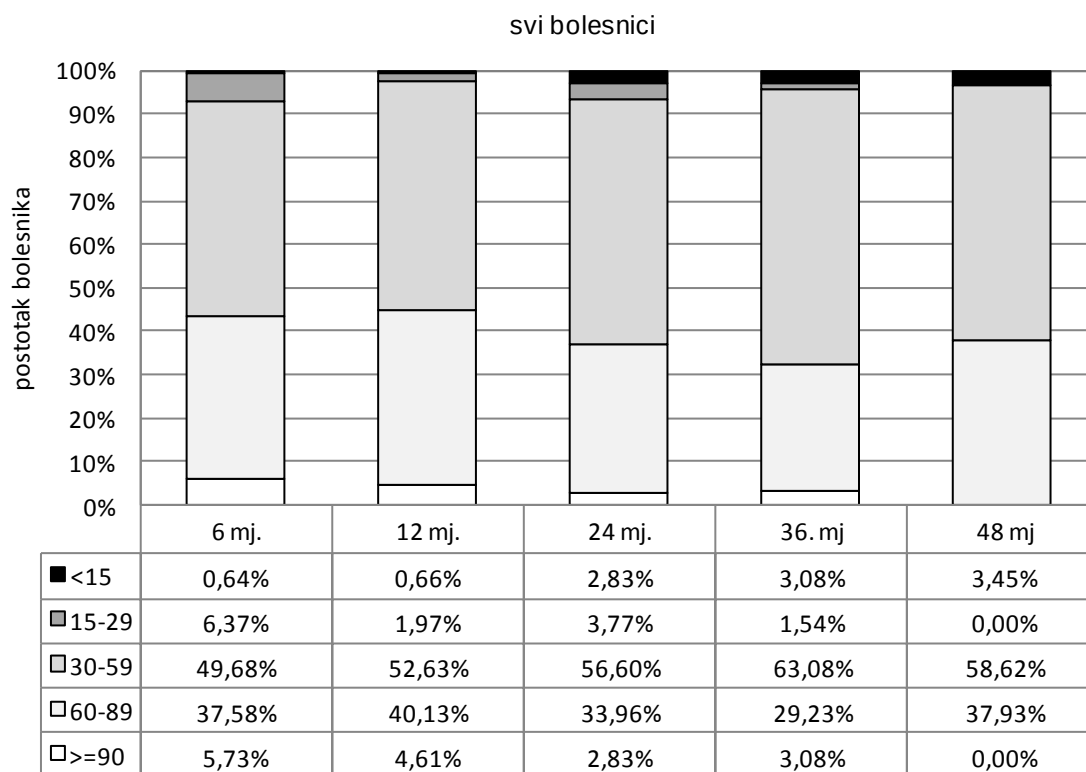


Slika 16. Odnos glomerularne filtracije prije transplantacije i prosječne promjene glomerularne filtracije od 1. do 48. mjeseca nakon transplantacije.



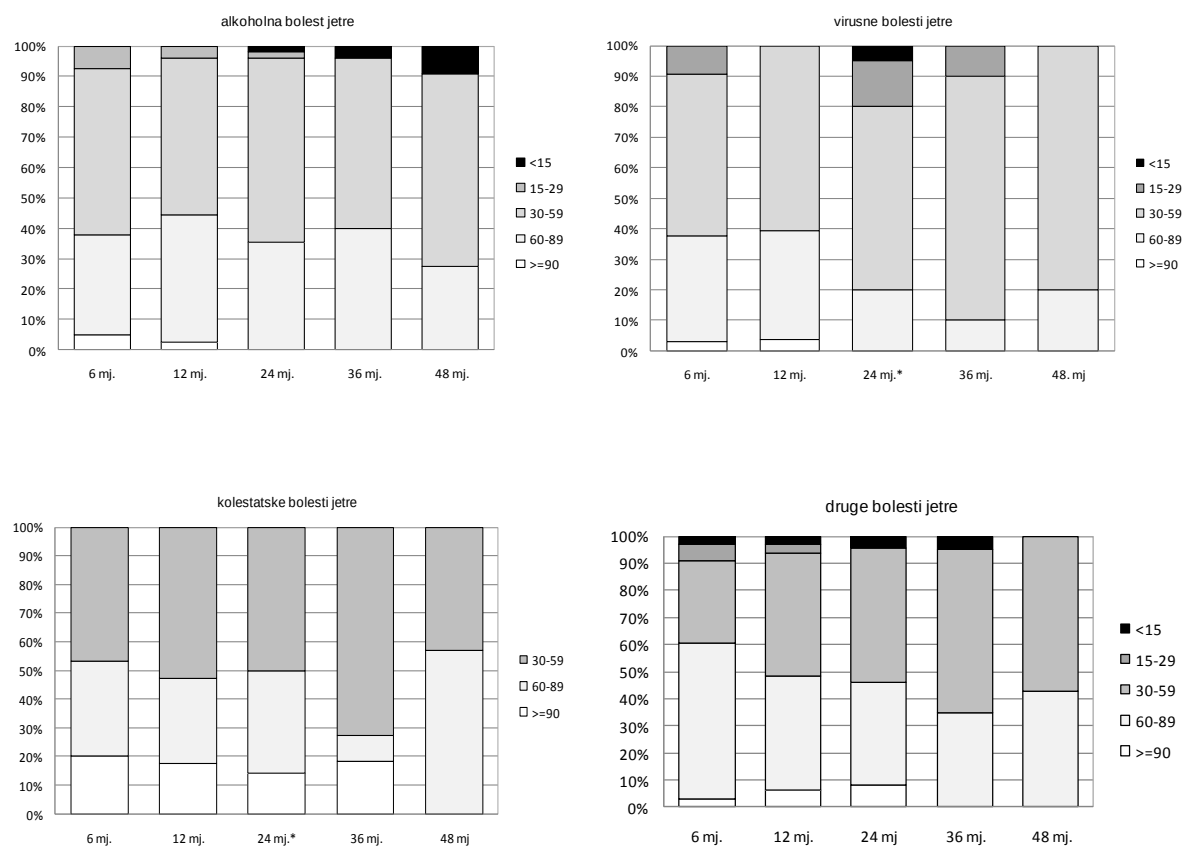
Slika 16. (nastavak) Odnos glomerularne filtracije prije transplantacije i prosječne promjene glomerularne filtracije od 1. do 48. mjeseca nakon transplantacije.

Zastupljenost pojedinih stadija bubrežnog oštećenja kod svih bolesnika u studiji prikazani su na Slici 17. Dvanaest mjeseci nakon TJ 40,13% bolesnika imalo je 2. stadij (60-89 ml/min/1.73m²), 52,63% 3. stadij (30-59 ml/min/1.73m²), 1,97% 4. stadij (15-29 ml/min/1.73m², a 0,66% 5. stadij (30-59 ml/min/1.73m²) bubrežnog oštećenja.



Slika 17. Zastupljenost stadija bubrežnog oštećenja kod svih bolesnika prema periodima nakon transplantacije jetre.

Zastupljenost pojedinih stadija bubrežnog oštećenja prema dijagnostičkim skupinama bolesti jetre prikazana je na Slici 18. Pojedini stadiji bubrežnog zatajenja bili su podjednako zastupljeni kod svih dijagnostičkih skupina u 6, 12, 36 i 48 mjesecu nakon transplantacije jetre (ANOVA, $p=ns$). U 24. mjesecu nakon transplantacije jetre bolesnici sa virusnim bolestima jetre imali su znatno lošiju bubrežnu funkciju u odnosu na bolesnike sa kolestatskim bolestima jetre (ANOVA s *post-hoc* Bonferronijevim testom, $p<0,05$).



Slika 18. Zastupljenost pojedinih stadija bubrežnog oštećenja u periodima nakon transplantacije jetre prema dijagnostičkim skupinama (*virusne u odnosu na kolestatske bolesti jetre, $p < 0,05$)

Poremećaji nalaza urina bili su česti u bolesnika nakon transplantacije jetre u rutinskim uzorcima analiziranim u razdoblju 1-6 mjeseci nakon TJ. Analiza jednokratnog uzorka urina s obzirom na proteinuriju i prisutnost leukocita i eritrocita u sedimentu urina nije se razlikovala između dijagnostičkih skupina ($p = n.s.$) (Tablica 13).

Tablica 13. Analiza urina nakon transplantacije.

Parametri	Ukupno n=123	Alkoholna bolest jetre n=68	Virusne bolesti jetre n=23	Kolestatske bolesti jetre n=10	Druge bolesti jetre n=22
Nalaz urina*, n (%)					
proteini (g/L)					
negativni	83 (67,5)	45 (66,2)	14 (60,9)	7 (70,0)	17 (77,3)
trag	20 (16,3)	12 (17,6)	4 (17,4)	2 (20,0)	2 (9,1)
0,3	10 (8,1)	4 (5,9)	4 (17,4)	1 (10,0)	1 (4,5)
1	7 (5,7)	5 (7,4)	0	0	2 (9,1)
>=3	3 (2,4)	2 (2,9)	1 (4,3)	0	0
leukociti pozitivni	14 (11,4)	5 (7,4)	4 (17,4)	1 (10,0)	4 (18,2)
eritrociti					
0-2	102 (82,9)	59 (86,8)	17 (73,9)	8 (80,0)	18 (81,8)
2-5	14 (11,4)	4 (5,9)	5 (21,7)	2 (20,0)	3 (13,6)
>5	7 (5,7)	5 (7,4)	1 (4,3)	0	1 (4,5)

*Nalaz jednokratnog uzorka urina 1-6 mjeseci nakon TJ.

4.6 Incidencija kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre

Tijekom praćenja nonovastala kronična bubrežna bolest ($\text{eGFR} < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$) razvila se u 99 bolesnika (50,3%). Kumulativna incidencija KBB u svih bolesnika nakon TJ iznosila je: za 12 mj. 54,5%, za 24 mj. 58,9%, za 36 mj. 63,6 % i za 48 mj. 69,7% (Slika 19).

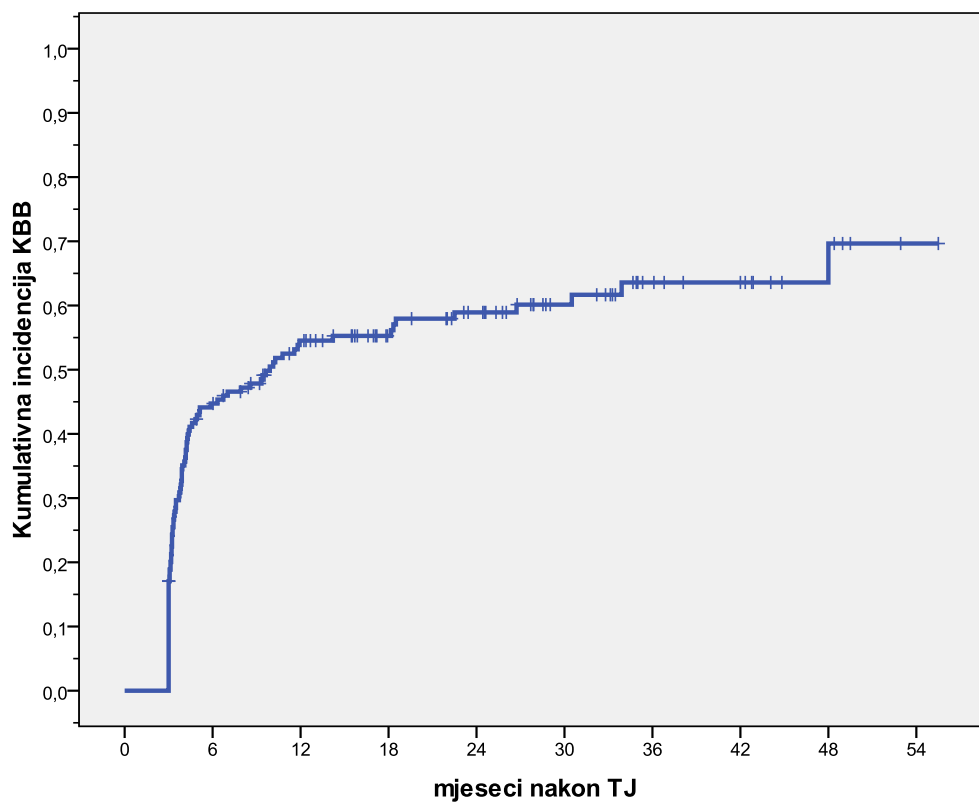
Učestalost KBB povećavala se s vremenom kod bolesnika sa svim kategorijama bolesti jetre.

Kumulativna incidencija novonastale KBB za alkoholnu bolest jetre bila je 56,6% za 12 mj., i 58,5% za 24 mj., 61,1% za 36 mj. i 48 mj. Numerički najveću kumulativnu incidenciju KBB imale su virusne bolesti jetre: 58,5% (12 mj.), 73,1% (24 mj.), 82,1% (36 mj.) i 100% (48 mj.), međutim analiza krivulja incidencije između skupina prema dijagnozama bolesti jetre nije dosegla statističku značajnost (log-rank, $p=0,259$).

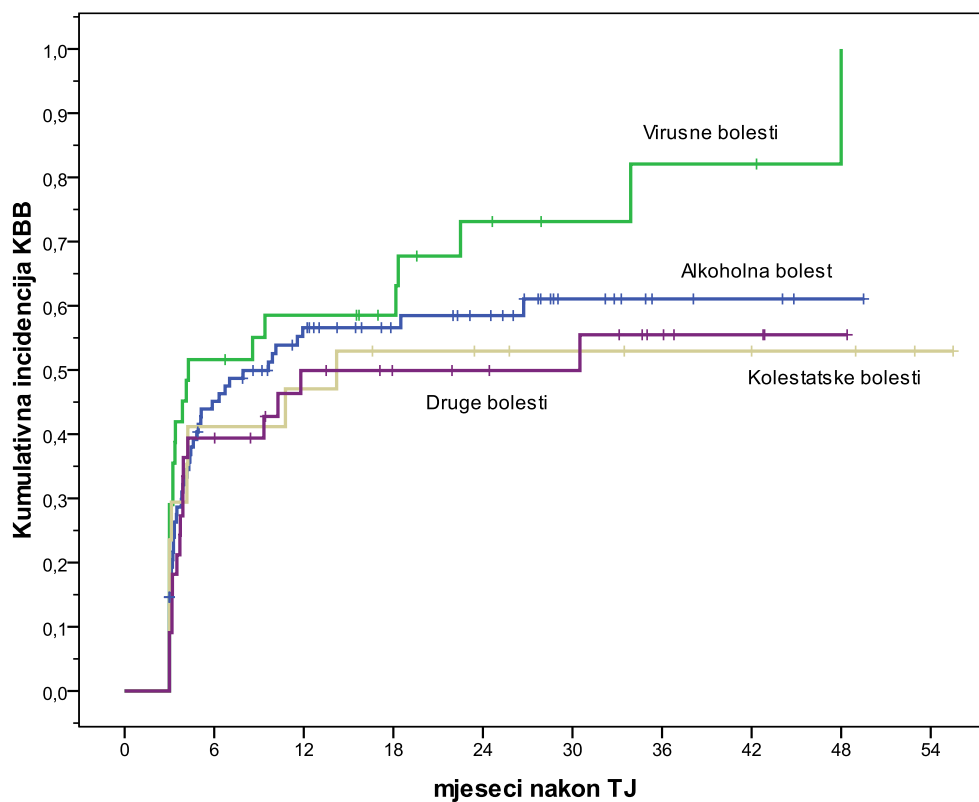
Numerički najniža kumulativna incidencija KBB bila je kod kolestatskih bolesti jetre i iznosila je 47,1% (12 mj.) i 52,9% (24 mj., 36 mj., 48 mj.) (Slika 20, Tablica 14).

Tablica 14. Kumulativna incidencija kronične bubrežne bolesti prema dijagnostičkoj skupini.

Dijagnoza	Kumulativna incidencija KBB nakon TJ			
	12 mj.	24 mj.	36 mj.	48 mj.
	postotak %			
Alkoholna bolest jetre	56,6	58,5	61,1	61,1
Virusne bolesti jetre	58,5	73,1	85,1	100
Kolestatske bolesti jetre	47,1	52,9	52,9	52,9
Druge bolesti jetre	49,9	49,9	55,5	55,5



Slika 19. Kumulativna incidencija kronične bubrežne bolesti ($\text{eGFR} < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$) nakon transplantacije jetre kod svih bolesnika.



Slika 20. Kumulativna incidencija kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre prema dijagnostičkim skupinama.

4.7 Analiza čimbenika rizika za razvitak novonastale kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre

U svrhu utvrđivanja faktora rizika za razvitak kronične bubrežne bolesti učinjena je univarijatna analiza metodom Coxove regresije, kojom su izdvojeni statistički značajni faktori.

Kao potencijalni faktori rizika za razvitak novonastale kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre uključene su varijable prikazane u Tablici 15.

U univarijantnoj analizi kao statistički značajni faktori rizika za razvitak novonastale kronične bubrežne bolesti identificirani su slijedeći predtransplantacijski pokazatelji: starija dob bolesnika, prisutnost arterijske hipertenzije prije transplantacije jetre, infekcija hepatitisom C, smanjena glomerulska filtracija prije transplantacije, te posttransplantacijski pokazatelji: primjena akutnog nadomjesnog bubrežnog liječenja, smanjena glomerulska filtracija u 1. mjesecu nakon transplantacije i prisutnost proteinurije.

Univarijatna analiza je pokazala da se obzirom na dob 1,06 puta povećava rizik za nastanak KBB za svaku godinu starosti (HR 1,06; 95% CI 1,03–1,08, $p < 0,001$). Infekcija virusom hepatitisa C 1,79 puta (HR 1,79; 95% CI 1,10–2,93, $p = 0,020$), a pridruženost arterijske hipertenzije prije transplantacije jetre 1,83 puta (HR 1,83; 95% CI 1,134–2,96, $p = 0,013$) povisuje rizik za nastanak KBB-a. Statistički značajan faktor koji pridonosi razvitku KBB je stupanj bubrežne funkcije prije transplantacije jetre te da smanjenjem stupnja 2,19 puta (HR 2,19; (95% CI 1,75–2,75, $p < 0,001$) raste rizik od razvitka KBB-a.

Primjena ANBL nakon transplantacije povezana je s 3,5 puta većim rizikom za nastanak KBB (HR 3,50; 95% CI 1,40–8,75, $p = 0,007$) u odnosu na bolesnike koji nisu zahtjevali primjenu ANBL, dok proteinurija taj rizik je povećan 1,37 puta (HR 1,37; 95% CI 1,12–1,67, $p = 0,002$). Smanjenjem stupnja glomerulske filtracije u 1. mjesecu nakon transplantacije rizika za razvitak KBB povisuje se 2,25 (HR 2,25; 95% CI 1,77–2,86, $p < 0,001$) puta u odnosu na viši stupanj.

Tablica 15. Rezultati univarijatne analize pojedinačnih faktora rizika za razvoj KBB nakon transplantacije jetre.

Varijabla	HR (95% CI)	p
Parametri prije transplantacije		
Dob primatelja	1,06 (1,03–1,08)	0,000
Spol primatelja		
ženski	1 (referentno)	
muški	0,680 (0,453–1,021)	0,063
Alkoholna bolest jetre	0,98 (0,66–1,46)	0,919
Hepatitis C virus	1,79 (1,10–2,93)	0,020
Kolestatska bolest jetre	0,78 (0,39–1,56)	0,479
Druge bolesti jetre	0,78 (0,46–1,31)	0,342
Pridruženi malignom jetre	0,73 (0,43–1,25)	0,248
Šećerna bolest	1,07 (0,62–1,83)	0,817
Arterijska hipertenzija	1,83 (1,134–2,96)	0,013
ANBL prije TJ	1,35 (0,33–5,50)	0,674
MELD	1,02 (0,99–1,05)	0,222
Kreatinin u serumu prije TJ	1,008 (1,005–1,011)	0,000
Stupanj bubrežnog oštećenja prije TJ	2,19 (1,75–2,75)	0,000
Dob donora	1,00 (0,99–1,02)	0,705
Spol donora		
ženski	1 (referentno)	
muški	1,207 (0,78–1,869)	0,399
Ukupna HLA nepodudarnost	1,035 (0,827–1,297)	0,762
HLA-A	0,914 (0,603–1,386)	0,573
HLA-B	0,782 (0,487–1,257)	0,782
HLA-DR	1,480 (0,952–2,299)	0,081
Parametri poslije transplantacije		
ANBL poslije TJ	3,50 (1,40–8,75)	0,007
Trajanje ANBL (dana)	1,01 (0,91–1,13)	0,830
Kalcineurinski inhibitor		
takrolimus	1 (referentno)	
ciklosporin	1,478 (0,969–2,255)	0,069
Akutno odbacivanje jetre	1,43 (0,80–2,55)	0,227
Kreatinin u serumu 1 mj. nakon TJ	1,010 (1,006–1,013)	0,000
Stupanj bubrežnog oštećenja 1 mj. nakon TJ	2,25 (1,77–2,86)	0,000
Proteinurija	1,37 (1,12–1,67)	0,002
Leukociturija	1,28 (0,65–2,49)	0,475
Eritrociturija	1,11 (0,72–1,71)	0,643

U multivarijatnu analizu uključeni su svi faktori iz univarijatne analize koji su pokazali statistički značajnu ($p < 0,05$) povezanost s KBB. Kreatinin kao i ANBL prije transplantacije jetre nisu uključeni u multivarijatnu analizu radi kolinearnosti s glomerularnom filtracijom.

Iz Coxove multivarijatne analize slijedi da je rizik za razvitak KBB povezan sa starijom dobi bolesnika, infekcijom virusa hepatitis C, stupnjem burežnog oštećenja prije transplantacije te stupnjem bubrežnog oštećenja u prvom mjesecu nakon transplantacije jetre. Međutim arterijska hipertenzija prije transplantacije kao i proteinurija nisu neovisno povezane s razvojem KBB (Tablica 16).

Tablica 16. Coxova multivarijatna analiza povezanosti faktora rizika za razvoj kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre.

Varijabla	HR (95% CI)	p
Dob bolesnika	1,038 (1,005-1,072)	0,025
Hepatitis C virus	2,205 (1,133-4,290)	0,020
Arterijska hipertenzija	0,910 (0,443-1,872)	0,798
Proteinurija	0,920 (0,708-1,196)	0,535
Stupanj bubrežnog oštećenja prije TJ	2,125 (1,495-3,021)	0,000
Stupanj bubrežnog oštećenja u 1 mj nakon TJ	1,850 (1,317-2,599)	0,000

Svakom godinom starosti bolesnika 1,038 puta (HR, 1,038 95% CI 1,005-1,072, $p=0,25$) povećava se rizik od razvoja KBB-a, a pridruženost infekcije hepatitis C virusom 2,205 puta (HR, 2,205; 95% CI 1,133-4,290, $p=0,02$) povećava rizik od nastanka KBB. Porast stupnja bubrežnog oštećenja prije transplantacije 2,125 puta (HR 2,125 95%CI 1,495-3,021, $p<0,001$) dok porastom stupnja bubrežnog oštećenja u prvom mjesecu nakon transplantacije 1,85 puta (HR 1,850; 95% CI 1,317-2,599, $p<0,001$) raste rizik od KBB nakon TJ.

4.8 Etiologija kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre

Od 99 bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti u 33 (33,3%) bolesnika učinjena je biopsija bubrega. Prosječna dob bioptiranih bolesnika bila je $53,33 \pm 7,64$ godina. Nije bilo statistički značajne razlike u starosti između skupina bolesnika s KBB biopsijom bubrega u odnosu na skupinu koja nije bioptirana. Odnos spolova između skupina bio je podjednak između skupine s biopsijom bubrega i skupinom bez biopsije bubrega ($p=n.s.$) pri čemu se 66,7% bili muškarci.

U većine bolesnika s biopsijom bubrega indikacija za transplantaciju jetre bila je alkoholna bolest (60,6%). Indikacije za transplantaciju jetre (alkoholna bolest, virusne bolesti, kolestatske bolesti i druge bolesti jetre) bile su podjednake kod bolesnika sa i bez biopsije bubrega ($p=n.s.$).

33,3% bioptiranih bolesnika prije transplantacije imalo je arterijsku hipertenziju, 12,1% šećernu bolest, a 9,1 % pridruženu malignu bolest jetre. Između skupina nije bilo statistički značajne razlike u zastupljenosti pridruženih bolesti prije transplantacije ($p=n.s.$).

ANBL prije transplantacije bilo je podjednako zastupljeno u obje skupine ($p=n.s.$).

9,1% bolesnika kojima je kasnije učinjena biopsija bubrega u neposrednom poslijetransplantacijskom razdoblju liječeni su ANBL s prosječnim trajanjem od $13,0 \pm 13,75$ dana. S obzirom na ANBL kao i na dužinu trajanja postupka poslije transplantacije između skupina s i bez biopsije nije bilo statistički značajne razlike ($p=n.s.$).

Podaci su prikazani na Tablici 17.

Tablica 17. Parametri bolesnika sa kroničnom bolesti bubrega s biopsijom bubrega i bez biopsije bubrega.

Parametri	Bolesnici sa KBB BEZ biopsije bubrega n=66	Bolesnici sa KBB S biopsijom bubrega n=33
Dob primatelja, god ±SD	54,05±8,35	53,33±7,64
Spol, n (%) muški ženski	38 (57,6) 28 (42,4)	22 (66,7) 11 (33,3)
Parametri prije TJ n (%)		
alkoholna bolest jetre	31 (47,0)	20 (60,6)
virusne bolesti jetre	17 (25,8)	6 (18,2)
hepatitis B	3 (4,5)	1 (3,0)
hepatitis C	15 (22,7)	5 (15,2)
kolestatska bolest jetre	5 (7,6)	4 (12,1)
druge bolesti jetre	13 (19,7)	3 (9,1)
malignomi	13 (19,7)	3(9,1)
šećerna bolest	12 (18,2)	4(12,1)
arterijska hipertenzija	11 (16,7)	11 (33,3)
kreatinin (μmol/L)±SD	107±48,91	117,94±52,29
eGFR (mL/min/1.73 m2)±SD	67,72±22,64	63,78±24,31
ANBL, n (%)	1 (1,5)	1 (3,0)
Parametri poslije TJ		
ANBL, n (%)	2 (3,0)	3 (9,1)
trajanje dijalize, dana±SD	7±0	13,00±13,75
analiza urina, n(%)		
*protein		
negativni	31 (47,0)	14 (42,4)
protein trag	9 (13,6)	3 (9,1)
protein 0,3 g/L	5 (7,6)	4,(12,1)
protein 1 g/L	1 (1,5)*	6 (18,2)*
protein ≥3 g/L	0*	2 (6,1)*
leukociti pozitivni	6 (9,1)	4 (12,1)
eritrociti 0-2	40 (60,6)	21 (63,6)
eritrociti 2-5	4 (6,1)	5 (15,2)
eritrociti >5	2 (3,0)	3 (9,1)
Biopsija bubrega nakon TJ, mjeseci (raspon)	x	14 (3-60)
eGFR prilikom biopsije bubrega (mL/min/1.73 m2)±SD	x	34,97±12,78

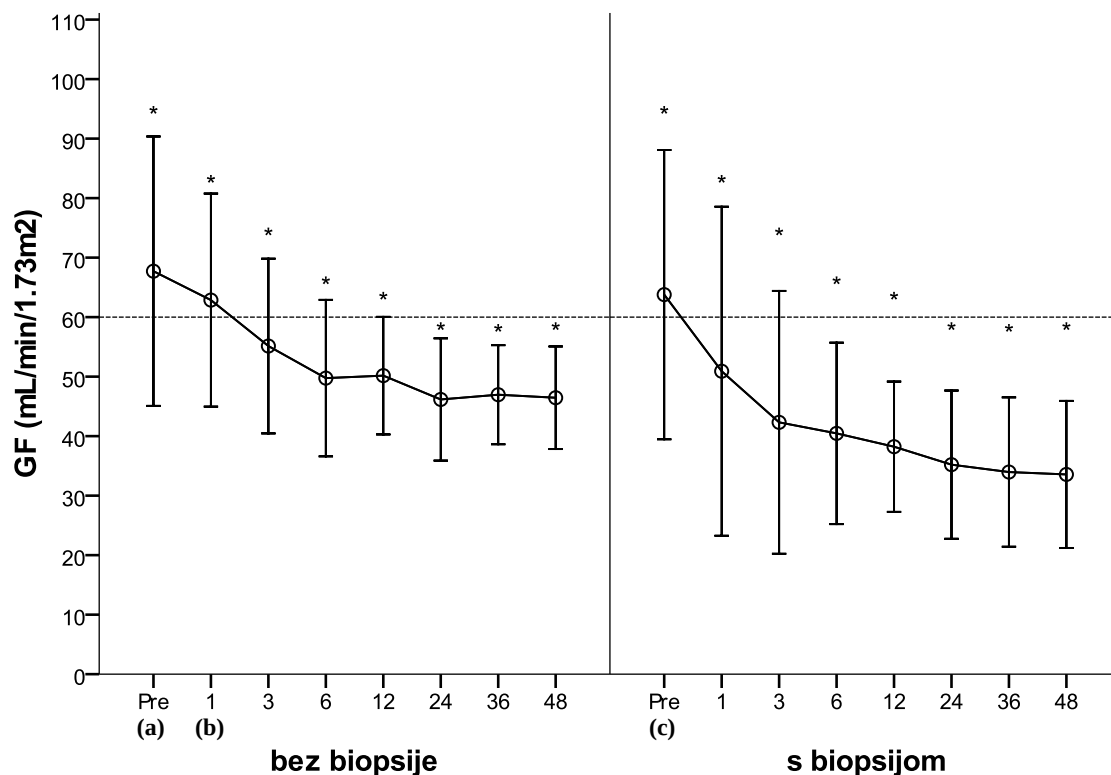
ANBL – akutno nadomjesno bubrežno liječenje, *s BB vs bez BB, p<0,05

Srednja vrijednost eGFR bioprirane skupine prije transplantacije bila je $63,78 \pm 24,31$ (mL/min/1.73 m²) i statistički se nije razlikovala u odnosu na skupinu bez biopsije (p=n.s.). Kod bolesnika s biopsijom došlo je do pada eGFR nakon TJ, ali unutar 1 mjeseca nakon TJ taj pad nije bio statistički značajan (p=n.s.), nakon čega je u kasnijim mjesecima 3-36 mj. u odnosu na eGFR prije TJ uslijedilo značajno pogoršanje bubrežne funkcije (3 mj. p<0,01, 6 mj. p<0,01, 12 mj. p<0,001, 24 mj. p<0,001, 36 mj. p<0,01). Nakon prvog mjeseca tendencija pada glomerularne filtracije se nastavila do kraja praćenja, ali nije bila statistički značajna između pojedinih perioda praćenja (p=n.s.)

Kod bolesnika bez biopsije također je došlo do pada eGFR nakon TJ. Unutar prvog mjeseca nakon TJ taj pad nije bio statistički značajan (p=n.s. u odnosu na prije TJ), dok je u kasnijim periodima nakon TJ uslijedilo značajno pogoršanje bubrežne funkcije (3 mj. p<0,01, 6 mj. p<0,001, 12 mj. p<0,001, 24 mj p<0,001, 36 mj p<0,001, 48 mj p<0,05). Nakon prvog mjeseca tendencija pada glomerularne filtracije se nastavila do kraja praćenja i bila je statistički značajna za 6. mj. (p<0,01), 24. mj. (p<0,01) i 36. mj. (p<0,01) u odnosu na 1. mj. Između ostalih promatranih razdoblja postojala je tendencija smanjenja eGFR s trajanjem razdoblja nakon TJ, ali te promjene nisu dosegle statističku značajnost (p=n.s. između 12, 24, 36 i 48 mj.)

Prosječna eGFR kod bolesnika bez biopsija bila je statistički značajno viša u odnosu na prosječnu eGFR kod bolesnika s biopsijom za sve promatrane periode (1 mj p<0,01, 3 mj. p<0,001, 6 mj p<0,001, 12 mj p<0,001, 24 mj p<0,001, 36 mj. p<0,001, 48 mj p<0,01) (Slika 21).

Najčešća indikacija za biopsiju bubrega bilo je pogoršanje bubrežne funkcije. Kod većine biopriranih bolesnika (51,5%) nalaz proteina u urinu bio je negativan ili u tragu, dok su različiti stupnjevi proteinurije bili zastupljeni u 36,4% slučajeva. Bioprirani bolesnici imali su češće proteinuriju u odnosu na bolesnike bez biopsije (p<0.05). U sedimentu urina kod većine bolesnika nije zabilježena leukociturija (87,9) niti eritrociturija (63,6 %), a statistički značajna razlika u donosu na skupinu bez biopsija nije zabilježena (p=n.s.) (Tablica 17).



Slika 21. Kretanje bubrezne funkcije u pojedinačnoj skupini nakon transplantacije i razlike prosječne eGFR ($\mu\text{mol/L/1,73 m}^2$) između skupina bolesnika.

*statistički značajne razlike između skupina; a) statistički značajne razlike u eGFR prije TJ u odnosu na 3-48 mj. u skupini bez biopsije; b) statistički značajne razlike eGFR u 1. mj. u odnosu na 6-36. mj u skupini bez biopsije; c) statistički značajne razlike eGFR prije TJ u odnosu na 3-36. mj. u skupini s biopsijom. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti $\pm$ SD.

Biopsija bubrega u prosjeku je učinjena 14 (raspon, 3-60) mjeseci nakon transplantacije jetre.

Prosječna vrijednost eGFR prilikom biopsije bubrega iznosila je $34,12 \pm 13,30 \text{ mL/min/1.73 m}^2$.

Na bioptičkim preparatima prosječan broj glomerula bio je 16 (5-38).

Kod 90,9% nalaza uzrok bubrežnog oboljenja temeljio se na jednoj patohistološkoj dijagnozi.

Patohistološke dijagnoze bile su slijedeće: kalcineurinska nefrotoksičnost (51,5%), trombotska mikroangiopatija (9,1%), bolesti glomerula (18,2%), nefroangioskleroza (15,2%), dijabetička nefropatija (9,1%), akutno tubularno oštećenje (3,0%). U 3 (9,1%) nalaza biopsije bubrega utvrđene su po dvije osnovne dijagnoze bubrežne bolesti. Patohistološke dijagnoze prikazane su u Tablici 18.

Tablica 18. Patohistološke dijagnoze bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre.

Dijagnoza bubrežne bolesti	Bolesnici* n (%)
Kalcineurinska nefrotoksičnost	17 (51,5)
Trombotska mikroangiopatija	3 (9,1)
Akutno tubularno oštećenje	1 (3,0)
Nefroangioskleroza	5 (15,2)
Dijabetička nefropatija	3 (9,1)
Bolesti glomerula	
IgA nefropatija	3 (9,1)
fokalna segmentalna glomeruloskleroza	2 (6,1)
lipoproteinska glomerulopatija	1 (3,0)
Papilarni tumor**	1 (3,0)

*3 (9,1%) nalaza biopsije bubrega imalo je po dvije osnovne dijagnoze bubrežne bolesti, ** papilarni tumor bubrega prije biopsije nije verificiran morfološkim metodama

Izbor karakterističkih pathohistoloških nalaza prikazan je na Slikama 26-28 (stranice 58, 59).

Bolesnici su prema patohistološkim dijagnozama svrstani u slijedeće tri dijagnostičke kategorije: a) kalcineurinska nefrotoksičnost, b) hipertenzivna glomerulopatija i c) bolesti glomerula. Ukoliko je bolesnik imao više od jedne zaključene dijagnoze (3 slučaja) za klasifikaciju u dijagnostičko-terapijske skupine uzeta je dominantna dijagnoza (Tablica 19).

Tablica 19. Patohistološke kategorije bolesnika.

Parametri	Kalcineurinska nefrotoksičnost	Hipertenzivna nefropatija	Bolesti glomerula
Dob primatelja, god ±SD	53,16±8,08	53,60±3,85	53,75±9,83
Spol, (%) (M) % (Ž)%	(M) 57,9%; (Ž) 42,1%	(M) 80,0 (Ž) 20,0%	(M) 87,5% (Ž) 12,5%
Parametri prije TJ (%)			
alkoholna bolest jetre	63,2%	40,0%	75,0%
hepatitis B virus	5,3%	0	0
hepatitis C virus	15,8%	20,0%	12,5%
malignomi	10,5%	0	12,5%
šećerna bolest	10,5%	0	25,0%
arterijska hipertenzija	15,8%	60,0%	50,0 %
kreatinin (μmol/L)±SD	90,74±29,72	156,40±81,39	117,00±27,97
eGFR (mL/min/1.73 m ²)±SD	70,97±24,13	49,76±24,44	61,38±15,97
Parametri poslije TJ			
1 mj. eGFR (mL/min/1.73 m ²)±SD	48,16±23,26	70,05±46,54	51,64±21,43
Analiza urina			
protein negativni	52,9%	100%	14,3%
protein trag	11,8%	0	14,3%
protein 0,3 g/L	17,6%	0	14,4
protein 1 g/L	11,8%	0	42,9%
protein >=3 g/L	5,9%	0	14,3%
leukociti pozitivni	17,6%	0	0
eritrociti 0-2	94,1	50%	28,6
eritrociti 2-5	5,9	50%	28,6
eritrociti >5		0	42,9
Vrijeme od TJ do KBB (mj.±SD)	6,28±10,30	5,39±4,93	5,99±7,30
Biopsija bubrega nakon TJ, mjeseci, mj±SD	25,72±22,32	39,33±17,97	13,88±13,16
eGFR prilikom biopsije bubrega (mL/min/1.73 m ²)±SD	31,47±10,14	36,47±3,21	43,12±18,71
IF/TA			
odsutna	10,5%	0	12,5%
blaga	31,6%	40,0%	37,5%
umjerena	21,1%	20,0%	37,5%
teška	26,3%	20,0%	12,5%
vrlo teška	10,5%	20,0%	0

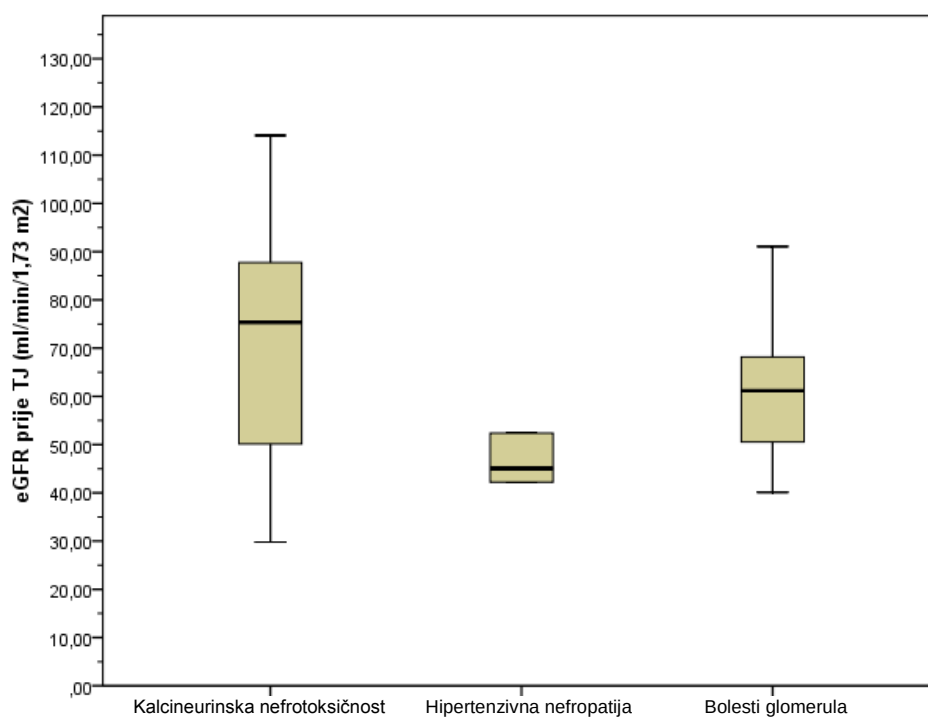
IF/TA intersticijska fibroza i tubularna atrofija određeni su kao postotak zahvaćenog parenhima kore bubrega u odnosu na ukupni parenhim kore bubrega u biopičkom uzorku

Od 33 bolesnika s histološki verificiranom kroničnom bubrežnom bolesti raspodjelom prema dijagnostičkim kategorijama 57,6% imalo je kalcineurinsku nefrotoksičnost, 15,2% hipertenzivnu nefropatiju, i 24,2% bolesti glomerula. 3,0% nije bilo moguće svrstati u pripadajuće kategorije (1 bolesnik sa akutnim tubularnim oštećenjem uzrokovanim intoksikacijom *Amanitom phalloides*).

Između skupina nije bilo statistički značajne razlike u starosti bolesnika ($p=n.s.$). Odnos spolova između skupina bio je podjednak, pri čemu su u većini bili muškarci ($p<0,05$).

Pridružene bolesti prije transplantacije (virusi hepatitisa, arterijska hipertenzija, šećerna bolest i malignomi) bili su podjednako raspoređeni između svih skupina ($p=n.s.$).

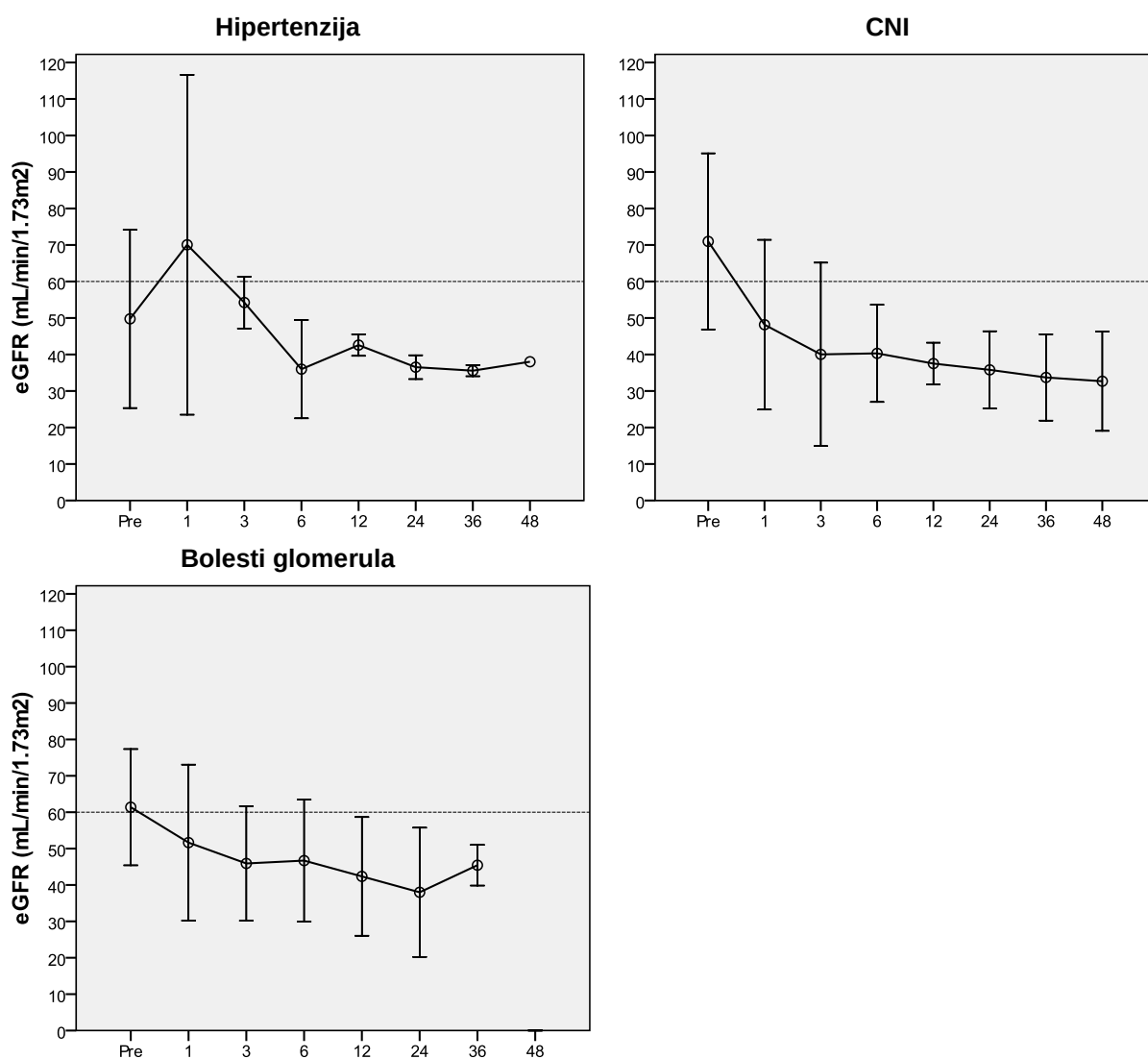
Nominalno najviše vrijednosti eGFR prije transplantacije imala je skupina sa CNI nefropatijom, a najniže eGFR skupina s hipertenzivnom nefropatijom, međutim između tri skupine nije nađena statistički značajna razlika u veličini eGFR ($p=n.s.$) (Slika 22).



Slika 22. Prosječna eGFR prije transplantacije prema histološkim skupinama ($p=n.s.$). Vrijednosti su prikazane kao medijani s interkvartilnim rasponom.

Nije nađena statistički značajna razlika u vremenu pojave KBB nakon transplantacije između tri skupine, iako je skupina s hipertenzivnom nefropatijom imala tendenciju najbrže pojave KBB-a ($p=n.s$).

Nije bilo statistički značajne razlike u veličini eGFR u svim mjeranjima od 1. do 48. mjeseca nakon transplantacije između skupina ($p=n.s$), iako je skupina s nefrotoksičnošću kalcineurinskih inhibitora imala veći pad eGFR u odnosu na skupinu s hipertenzivnom nefropatijom (Slika 23).

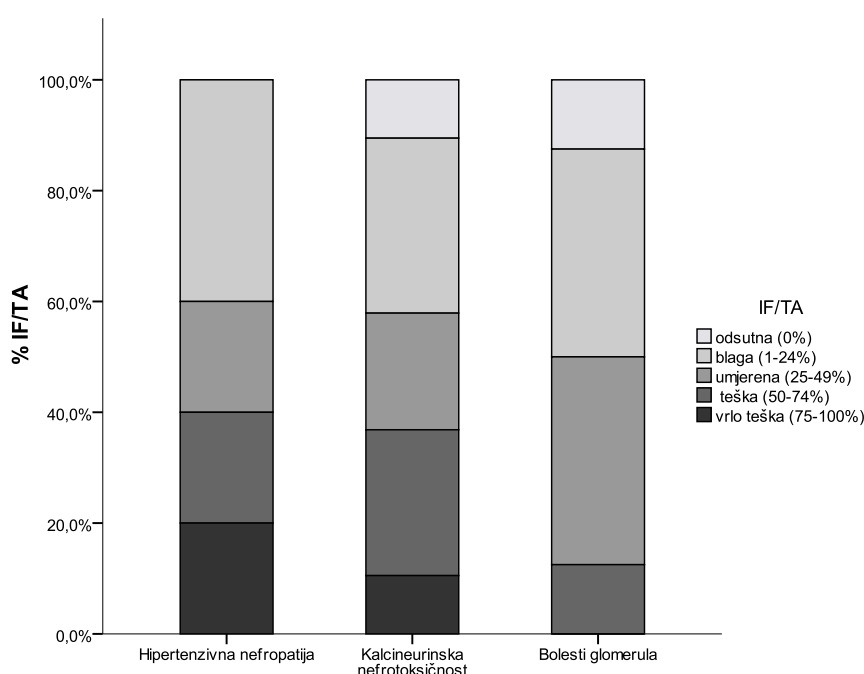


Slika 23. Kretanje bubrežne funkcije nakon transplantacije u tri etiološko-dijagnostičke skupine.

Kategorije bolesnika međusobno su se razlikovale prema prisutnosti proteinurije, te su bolesnici s glomerularnim bolestima imali češću i izraženiju proteinuriju u odnosu na skupinu sa

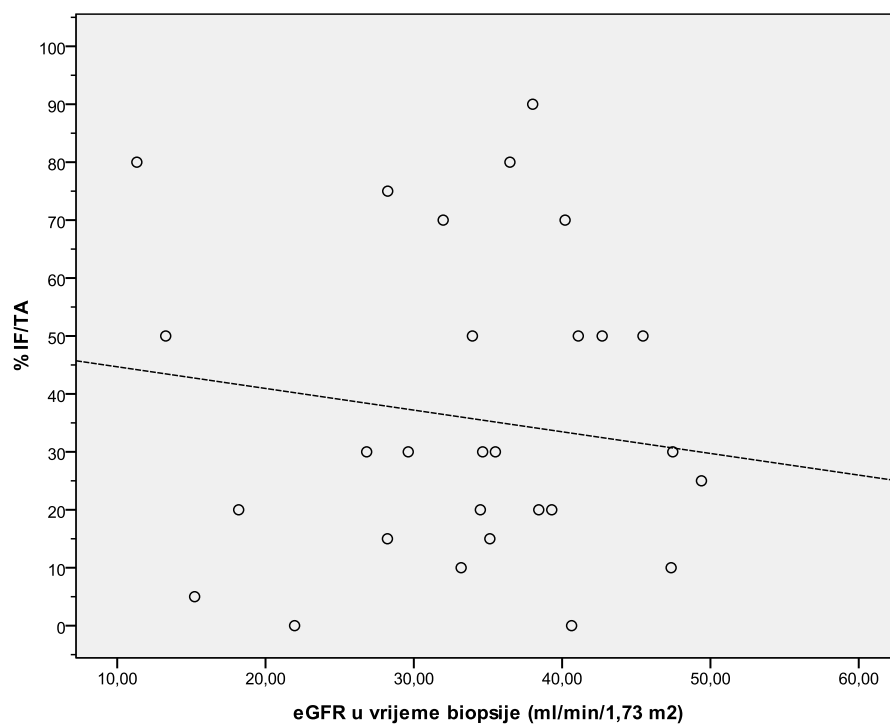
hipertenzivnom nefropatijom ($p=0,025$), ali ne i u odnosu na skupinu sa CNI nefropatijom ($p=0,124$). Između skupina sa CNI i hipertenzivnom nefropatijom također nije nađena statistički značajna razlika ($p=0,439$) u odnosu na proteinuriju. Skupine bolesnika također su se razlikovale prema prisutnosti eritrociturije. Skupina s bolestima glomerula imala je veću eritrocituriju u odnosu na CNI skupinu ($p<0,001$), dok u odnosu na hipertenzivnu nefropatiju nije utvrđena statistički značajna razlika ($p=0,643$). CNI i hipertenzivne skupine bile su podjednake obzirom na eritrocituriju ($p=0,421$).

Stupanj intersticijske fibroze i tubularne atrofije (IF/TA) određen je kao postotak zahvaćenog parenhima kore bubrega u odnosu na ukupni parenhim kore, te je bio podjednak u sve tri dijagnostičke skupine ($p=n.s.$) (Slika 24).

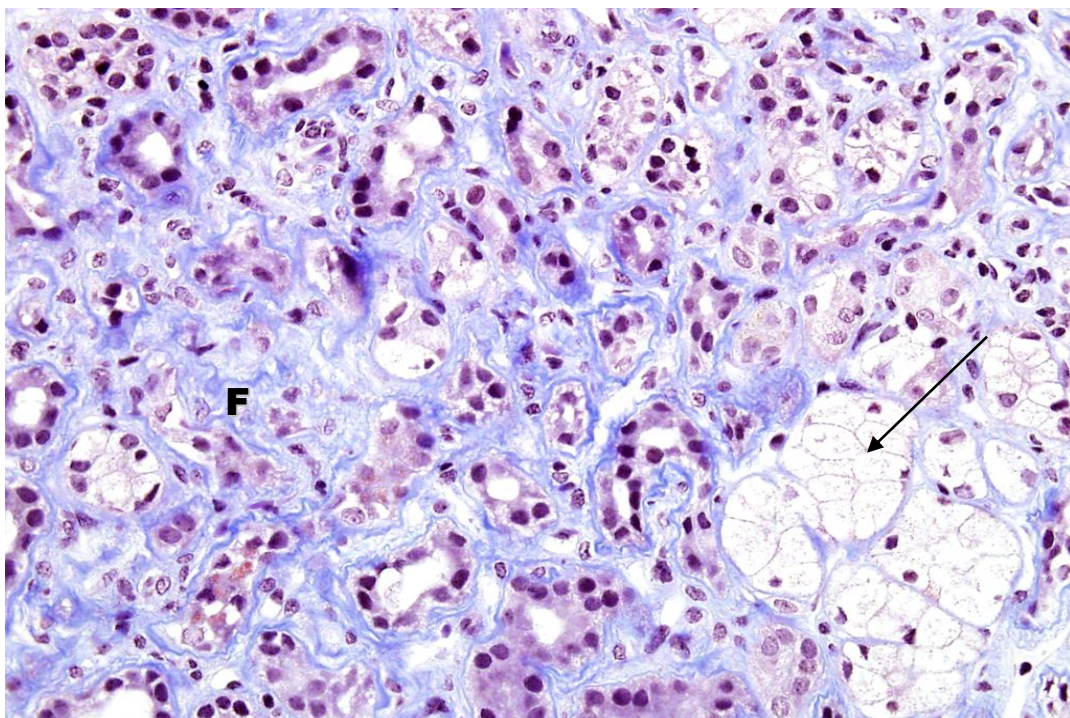


Slika 24. Stupnjevi intersticijske fibroze i tubularne (IF/TA) atrofije kod histoloških skupina ($p=n.s.$)

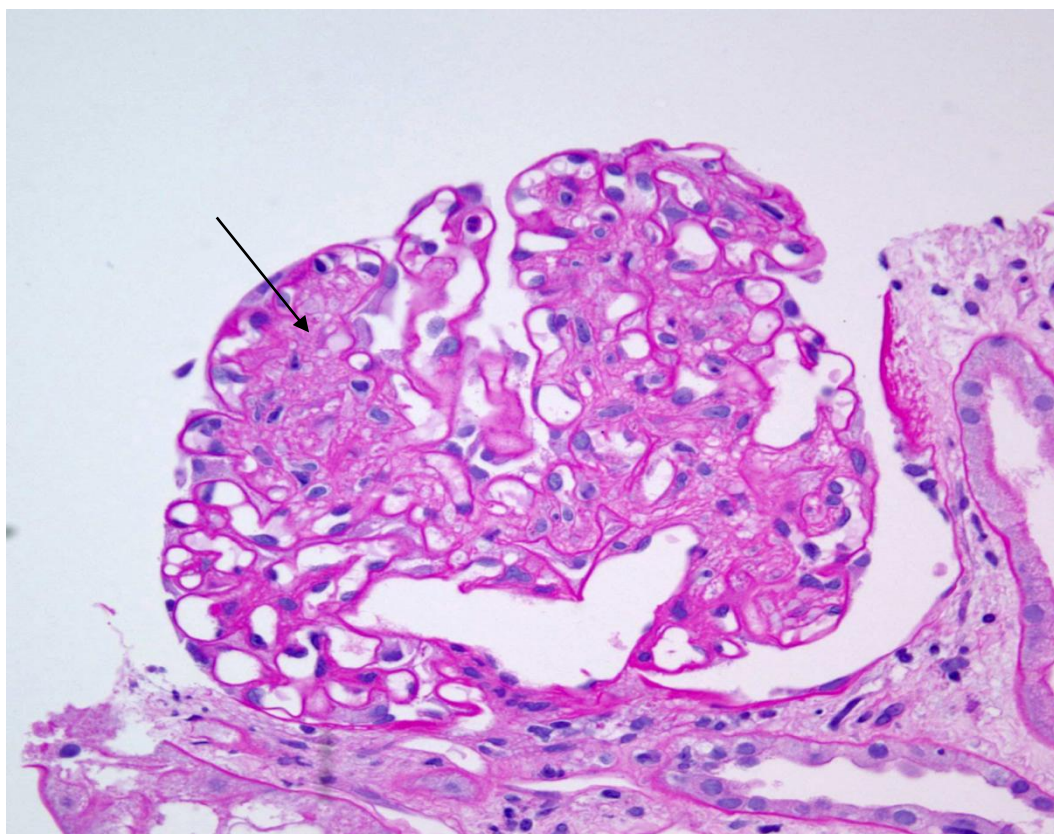
Stupanj IF/TA nije korelirao s veličinom eGFR prilikom biopsije niti u jednoj bioptiranoj podskupini ($p=n.s.$), a niti u skupini bolesnika bioptiranih bolesnika kao cjelini ($r_s=-0,068$ $p=0,724$). Odnos stupnja intersticijske fibroze i tubularne atrofije kod svih bioptiranih bolesnika prikazan je na Slici 25.



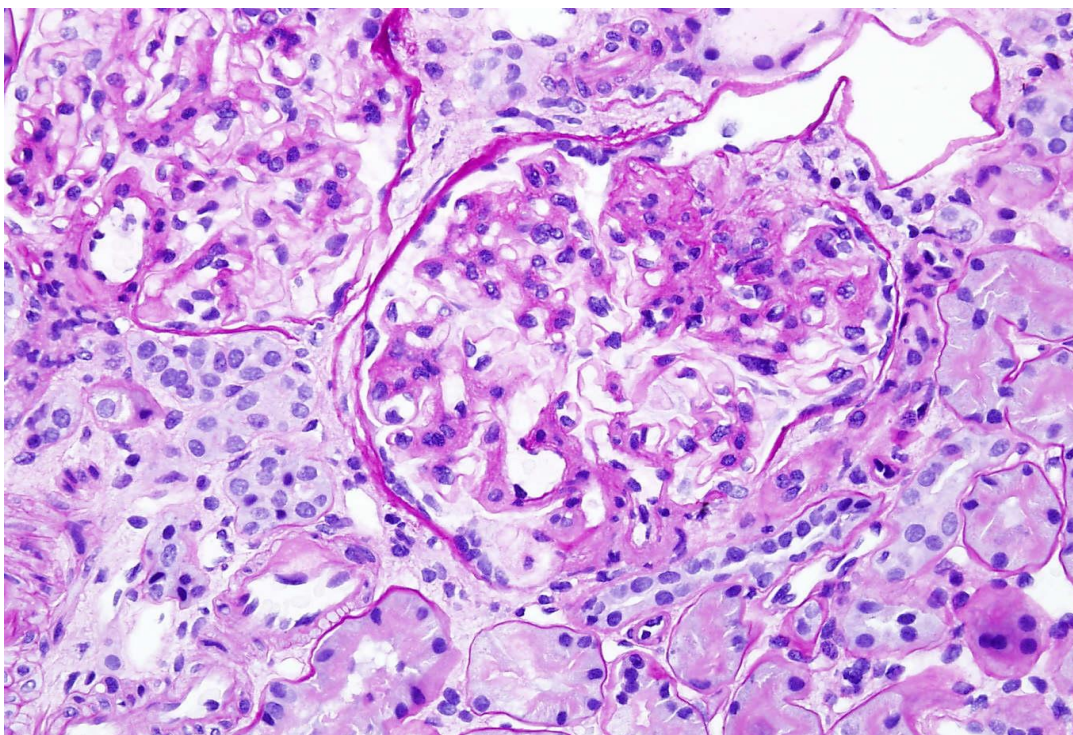
Slika 25. Korelacija stupnja intersticijske fibroze i tubularne atrofije kod svih bioptiranih bolesnika (p=n.s.).



Slika 26. Kalcineurinska nefrotoksičnost: sa izometričkom vakuolizacijom tubularnog epitela (strelica) i fibrozom (F) intersticija (Masson trikrom, x400 povećanje).



Slika 27. Trombotska mikroangiopatija: glomerul s mezangiolizom, dijelom zatvorenim lumenima kapilara i nabubrenim endotelom (PAS, x400 povećanje).



Slika 28. IgA nefropatija: glomerul s izraženim mezangijskim hipercelularitetom, segmentalnim ožiljkom i priraslicom (PAS, x400 povećanje).

5 RASPRAVA

Napredak u transplantacijskoj medicini, osobito u području kirurgije i farmakologije, doveo je do poboljšanog preživljenja bolesnika i presađaka. Poboljšanje ishoda transplantacije jetre unazad nekoliko desetljeća, prvenstveno je posljedica smanjenja morbiditeta i mortaliteta bolesnika i gubitka presatka unutar prvih 6-12 mjeseci [101]. Produženje života bolesnika pak omogućuje razvitak kroničnih komplikacija koji su posljedica brojnih faktora, od kojih su neki povezani s dugoročnom primjenom imunosupresije.

Kronična bubrežna bolest čest je problem nakon transplantacije jetre. Porastom broja transplantacija kao i sve dužim preživljenjem nakon transplantacije teret bubrežne bolesti u toj populaciji raste. Prevalencija KBB kreće se od 20 do 70%, dok pojava kronične bubrežne bolesti značajno otežava i poskupljuje liječenje i povećava smrtnost nakon transplantacije [1, 2].

U praćenju bolesnika neophodno je pravodobno dijagnosticirati i započeti liječenje KBB-a, budući da je u početnoj fazi bubrežne bolesti, kada još nisu prisutne uznapredovale kronične histološke promjene, moguće najučinkovitije utjecati na bubrežno oštećenje [61, 73, 76, 79, 80, 91, 93], čime bi se moglo utjecati na dugoročno preživljenje i na kvalitetu života transplantiranih bolesnika, a značajno bi se smanjili i troškovi liječenja.

Temeljni ciljevi ove disertacije bili su određivanje incidencije novonastale kronične bolesti bubrega, identifikacija faktora rizika za njezin nastanak, istraživanje kliničkog tijeka bubrežne bolesti, te određivanje etiologije KBB u kohorti bolesnika transplantiranih u KB Merkur.

Iako se nekoliko studija do sada bavilo problematikom kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre, studije koje se bave novonastalom kroničnom bubrežnom bolesti i njezinom etiologijom nakon transplantacije jetre rijetke su i nepotpune [1, 7, 8, 22, 102].

Ova studija je provedena na ukupno 197 bolesnika nakon transplantacije jetre koji prema definiciji nisu imali preegzistentnu bubrežnu bolest. Preegzistentna bubrežna bolest definirana je prisutnošću ranije histološki verificirane bolesti bubrega i/ili patološke proteinurije i eritrociturije i/ili povišenih vrijednosti kreatinina više od 125 $\mu\text{mol/L}$, odnosno smanjenje glomerularne filtracije ispod

60 mL/min/1.73m² izračunate prema MDRD formuli u trajanju dužem od 3 mjeseca prije TJ. S obzirom na vremenski kriterij za bubrežno oštećenje smatramo da je velika većina bolesnika s bubrežnim oštećenjem prije TJ imala akutno ili subakutno oštećenje bubrega, koje je potencijalno reverzibilno nakon transplantacije jetre, a da su bili isključeni bolesnici sa stvarnom KBB prije TJ. Ova pretpostavka je bila točna, jer su bolesnici s nižom eGFR prije TJ, nakon transplantacije u značajnom broju imali barem kratkotrajno značajno poboljšanje.

U studiji je učinjena analiza cjelokupne kohorte transplantiranih bolesnika s obzirom na razvitak KBB kao i podanaliza pojedinačnih skupina temeljenih na indikacijskim dijagnozama za transplantaciju. Bolesnici s alkoholnom bolesti jetre sačinjavali su gotovo polovicu ukupne populacije (50,3%), dok su ostale skupine bile manje zastupljene virusne bolesti jetre (18,84%), kolestatske bolesti jetre (9,6%) te druge bolesti jetre (21,3%). Ovakva raspodjela kohorte s predominacijom alkoholne bolesti jetre kao vodećom indikacijom za transplantaciju odgovara podacima o transplantaciji jetre za Hrvatsku, no međutim razlikuje se od europskih statistika gdje su vodeće virusne bolesti jetre (43%), a alkoholna bolest čini trećinu (33%) indikacijskih dijagnoza [103].

Za određenje veličine bubrežne funkcije u studiji korištena je procjenjena glomerularna filtracija (eGFR) bazirana na MDRD formuli. Procjena bubrežne funkcije bilo kojom formulom kod bolesnika sa cirozom jetre ima ograničenja, iako je nekoliko ranijih studija koristilo MDRD formulu [1, 102, 104, 105]. Odabir formule temeljio se na radu Gonwa i suradnika koji su evaluacijom tri formule procjene glomerulske filtracije: MDRD, Cockcroft Gault i Nankivell u odnosu na klirens I¹²⁵ iotalamata, pokazali najpreciznijom MDRD formulu na uzorku transplantirane populacije [7]. Svakako bi za utvrđivanje stvarne razine glomerularne filtracije idealna bila primjena klirensa inulina ili izotopske metode, ali je to teško ostvariti u uvjetima rutinskog praćenja bolesnika [106].

Ranije studije koje su se bavile problemom kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre pokazale su da se incidencija KBB povećava s vremenom nakon transplantacije jetre [9, 11, 107, 108]. Ovo istraživanje se načelno slaže s time.

Od ukupnog broja praćenih bolesnika bolesnika kod 50,3% (99 bolesnika) razvila se kronična bubrežna bolest. S dužim razdobljem praćenja nakon TJ povećavala se kumulativna incidencija KBB,

tako da je u ovoj studiji kumulativna incidencija novonastale KBB iznosila: za 12 mj. 54,5%, za 24 mj. 58,9%, 36 mj. 63,6 % i za 48 mj. 69,7%.

Ukupna incidencija KBB bila je viša u odnosu na prethodne studije, iako su definicije KBB u pojedinim studijama varirale, a većina studija nije uzimala u obzir blaže stupnjeve KBB [1, 9, 11, 107, 108]. Ovako visoka incidencija KBB-a dobro oslikava ovaj problem, jer se s dužim razdobljem praćenja može očekivati dodatno povećanje učestalosti uznapredovale KBB (4. i 5. stadija), odnosno potreba za bubrežnim nadomjesnim liječenjem u značajnog broja bolesnika.

Neke ranije studije sugerirale su da veličina bubrežne funkcije prije transplantacije nije najbolji prediktor kretanja bubrežne funkcije nakon transplantacije [14, 107]. Toj činjenici pridonosi problematična procjena bubrežne funkcije kod bolesnika s terminalnom bolesti jetre metodama koja se oslanjaju na vrijednosti kreatinina u serumu, gdje radi male mišićne mase, hiperbilirubinemije i promjene volumena distribucije kreatinina može doći do neprecizne procjene glomerulske filtracije. Međutim, MDRD formula, a u manjoj mjeri Cockcroft-Gaultova formula su u praksi najčešće korištene formule za procjenu bubrežne funkcije i u ovoj populaciji bolesnika, a serumska koncentracija kreatinina je sastavnica MELD bodovnog sustava, koji je mjera za procjenu rizika od smrti bolesnika s cirozom jetre i predstavlja temelj kod alokacije za transplantaciju jetre.

Veličina pada eGFR tijekom prvog mjeseca nakon transplantacije pozitivno je korelirala s veličinom eGFR prije transplantacije, tako da su veći pad doživjeli bolesnici s boljom eGFR prije transplantacije. Kod bolesnika s nižim vrijednostima eGFR prije transplantacije sniženje GFR bilo je manje izraženo, ili je dolazilo do oporavka GFR nakon TJ. Taj rezultat sličan je nalazu koji su nedavno objavili Lee i suradnici [109]. Pretpostavljamo da je ovaj posttransplantacijski oporavak bubrežne funkcije kod bolesnika s nižom predtransplantacijskom GFR bio posljedica oporavka reverzibilnog bubrežnog oštećenja, vjerojatno prvenstveno hepatorenalnog sindroma, čime je potvrđena adekvatnost selekcije bolesnika za studiju, kao i klinička odluka protiv simultane transplantacije jetre i bubrega kod nekih bolesnika s bubrežnim oštećenjem prije transplantacije.

Međutim ukupna prosječna eGFR svih bolesnika pogoršala se nakon transplantacije (statistički značajno u razdoblju dužem od 3 mjeseca nakon transplantacije). Navedeno ukazuje na značaj posttransplantacijskih faktora koji pridonose razvoju kronične bubrežne bolesti.

Odmakom od transplantacije se mijenjala i raspodjela zastupljenosti pojedinih stadija bubrežnog oštećenja. Dvanaest mjeseci nakon transplantacije 40,13% bolesnika imalo je 2. stadij, 52,63% 3. stadij, 1,97% 4. stadij, a 0,66% 5. stadij, bi dvije godina nakon došlo do progresije bolesti što se vidi prema raspodjeli 37,93% bolesnika u 2.stadij, 58,62% bolesnika u 3 stadij i 3,4% bolesnika u 5. stadij bubrežne bolesti.

Podanalizom studije se istražilo ponašanje bubrežne funkcije unutar i između pojedinačnih dijagnostičkih podskupina bolesnika.

Najveću kumulativnu incidenciju novonastale KBB imala je skupina virusnih bolesti jetre u kojoj se incidencija KBB kretala od 58,5% za 12 mj. do 100% za 48 mj, a najnižu incidenciju imala je skupina kolestatskih bolesti jetre u kojoj je iznosila 47,1% za 12 mj. i 52,9% za 48 mj. Ova razlika nije dosegla statističku značajnost, vjerojatno zbog relativno malog uzorka bolesnika. Međutim analizirajući odnos prosječne glomerularne filtracije između dvije navedene skupine dobivene su značajne razlike u težini bubrežnog oštećenja dvije godine nakon transplantacije (kada je broj bolesnika pod rizikom bio veći), što pokazuje da infekcija virusima hepatitisa u značajnoj mjeri pridonosi oštećenju bubrega. Ovo je zanimljivo opažanje, budući da u bolesnika s virusnim hepatitisom nismo opazili povećanu učestalost glomerulonefritisa kao što su to u svom radu prikazali Kim i suradnici [8]. Nejasno je na koji način je infekcija virusom hepatitis C povezana s nastankom KBB u odsutnosti glomerulonefritisa. Mogući mehanizmi bit će raspravljani kasnije.

U etiologiju razvoja kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre uključeni su multipli faktori rizika, koji sugeriraju složenost i multifaktorijalnost patogeneze. Oni uključuju stanje bubrežne funkcije prije transplantacije, demografske faktore, komorbiditete prije i nakon transplantacije: arterijsku hipertenziju, šećernu bolest, infekcije virusom hepatitisa C (HCV), zatim perioperativne incidente, razvoj akutnog bubrežnog zatajenja nakon transplantacije, te kalcineurinske inhibitore [1, 16, 17, 18, 22, 102]

Nekoliko studija do sada pokazalo je da viša životna dob i ženski spol predstavljaju povećani rizik za razvoj KBB [1, 22]. U ovoj studiji dob bolesnika izdvojila se kao nezavisni faktor rizika koji sa svakom godinom starosti bolesnika povećava 1,038 puta rizik od razvitka KBB. Spol bolesnika se u univarijantnoj analizi pokazao kao granično signifikantan za razvoj KBB ($p=0.063$) u korist muškoj populaciji, što međutim nije potvrđeno u multivarijantnom modelu.

Šećerna bolest, iako poznat faktor rizika za KBB nije se kao neovisni predtransplantacijski faktor izdvojio tijekom ove analize što može biti posljedica malog uzorka (16 bolesnika), dobre regulacije glikemije ili prekratkog praćenja u toj skupini.

Univarijantna analiza u studiji pokazala je da predtransplantacijska arterijska hipertenzija značajno povećava rizik od nastanka KBB 1,83 puta u odnosu na normotenzivnu populaciju, međutim u multivarijantnom modelu nije se izdvojila kao nezavisni faktor rizika.

MELD bodovni sustav, prediktor tromjesečnog preživljenja bolesnika sa cirozom jetre ključan je faktor prilikom alokacije bolesnika za transplantaciju jetre [98]. MELD je povezan s oporavkom hepatorealnog sindroma, akutnim nadomjesnim bubrežnim liječenjem i ranim zatajenjem bubrega nakon transplantacije [110, 111, 112]. MELD međutim nije povezan s razvojem KBB nakon TJ prema rezultatima ove studije.

Studija je pokazala da je hepatitis C nezavisni faktor rizika za razvoj KBB. HCV-pozitivni bolesnici imali su 2,205 puta veći rizik za razvitak KBB u odnosu na populaciju bez infekcije. Prema dosadašnjim istraživanjima rizik od razvitka KBB kod HCV-seropozitivnih bolesnika prvenstveno je bio posljedica razvoja glomerulonefritisa (GN) [8, 23, 24]. U ovoj studiji kod trećine HCV bolesnika s novonastalom KBB učinjena je biopsija bubrega, a histološka analiza u niti jednom slučaju nije pokazala znakove primarne bolesti glomerula karakteristične za virusne hepatitise (membranska nefropatija ili membranoproliferativni GN), već se u 80% slučajeva radilo o promjenama koje se bile odraz kalcineurinske nefrotoksičnosti. Iako malen, naš uzorak upućuje na činjenicu da je populacija HCV bolesnika osobito ugrožena s obzirom na ekspoziciju kalcineurinskim inhibitorima. Moguće je da su ovi bolesnici pojačano izloženi CNI-ima zbog češćih laboratorijskih znakova disfunkcije jetre i posljedične sumnje na akutno odbacivanje. Klinička sumnja na odbacivanje jetre i poteškoće u

patohistološkom razlikovanju recidiva hepatitisa C od akutnog odbacivanja mogli bi biti uzrokom izloženosti većoj kumulativnoj dozi kalcineurinskih inhibitora u ovih bolesnika. Ovu pretpostavku potrebno je provjeriti u narednim istraživanjima.

Kao nezavisni faktor rizika u studiji izdvojila se bubrežna disfunkcija prije transplantacije. Konkretno svakim porastom stupnja bubrežnog oštećenja prije transplantacije u multivarijantnom modelu taj rizik je bio povećan 2,125 puta.

Nadalje, primjena akutnog nadomjesnog bubrežnog liječenja prije transplantacije nije se pokazala faktorom rizika za razvitak KBB, što govori u prilog reverzibilnosti promjena bubrežnog oštećenja u terminalnoj bolesti jetre, koje se nakon uspješne transplantacije jetre oporavlja.

Primjena kalcineurinskog inhibitora, ciklosporina u odnosu na takrolimus u univarijantnoj analizi bila je sa graničnom značajnošću, povezana s češćim razvojem KBB. U multivarijantnoj analizi ciklosporin se nije potvrdio nezavisnim faktorom rizika. Manja nefrotoksičnost takrolimusa u odnosu na ciklosporin je još uvijek kontraverzna, a kao podloga tome razmatra se slabiji vazokonstriktorni učinak takrolimusa kao i slabija ekspresija citokina poput TGF- β kod njegove primjene [35, 36, 37, 38]. Međutim vjerojatnije je da je važnija veličina izloženosti kalcineurinskom inhibitoru nego izbor određenog lijeka.

Stadij bubrežnog oštećenja u ranom postoperativnom periodu (u 1. mjesecu) pokazao se nezavisnim faktorom rizika, pri čemu se promjenom stadija rizik od razvoja KBB-a 1,85 puta povećavao u odnosu na prethodni.

Nadalje u studiji smo također razmotrili značaj glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC eng. *major histocompatibility complex*) u odnosu na razvoj KBB. Uloga MHC prilikom transplantacije jetre i danas je kontroverzna. Prilikom transplantacije jetre ne uzima se u obzir HLA podudarnost, a alokacija se oslanja na kompatibilnost ABO krvnih grupa i kliničku urgentnost definiranu MELD bodovnim sustavom. Medicinska literatura nije dovoljno konzistentna s obzirom na ulogu histokompatibilnosti prilikom transplantacije jetre, iako su neke studije pokazale da određene populacije pacijenta poput skupina s autoimunim i virusnim bolestima jetre imaju korist od nižeg stupnja HLA nepodudarnosti [113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120]. Iako se jetra smatra imunološki

privilegiranim organom nedavna meta-analiza 16 kliničkih studija pokazala je da manja HLA nepodudarnost (0-2 vs 3-6) smanjuje incidenciju akutnog odbacivanja, ali da ne utječe na 1- i 5-godišnje preživljenje grafta [121]. S obzirom na navedeno u studiji je istražena povezanost HLA nepodudarnosti i akutnog odbacivanja grafta koja se na ispitivanoj kohorti nije ustvrdila. Nadalje istražena je povezanost HLA nepodudarnosti s razvojem KBB nakon transplantacije jetre, budući da terapija akutnog odbacivanja uključuje i trajnije povišenje imunosupresivne terapije i ekspozicije kalcineurinskom inhibitoru koje može pridonijeti razvoju burežnog oštećenja. S obzirom na ukupnu HLA nepodudarnost i razvitak kronične bubrežne bolesti nije nađena statistički značajna razlika između skupina s 0-2 i 3-6 nepodudarnosti. Analizom pojedinačnih epitopa HLA-A, HLA-B i HLA-DR s obzirom na 0 i 1-2 nepodudarnost i razvitak KBB nije nađena statistički značajna razlika za A, B, DR lokus.

U ovoj studiji su se dakle kao nezavisni faktori rizika za razvoj bubrežne bolesti (eGFR<60) na našoj populaciji identificirali: dob bolesnika, infekcija virusom hepatitisa C, te stupanj bubrežne funkcije prije transplantacije kao i stupanj bubrežne funkcije u 1. mjesecu nakon transplantacije jetre.

Nadalje radi utvrđivanja etiologije KBB kod 33,3% (33 bolesnika) učinjena je biopsija bubrega nakon transplantacije. Ovakav pristup KBB nakon TJ pokazao se ispravnim, budući da nije bilo značajne korelacije između pojedinih kliničko-laboratorijskih obilježja i patohistoloških dijagnoza.

U studiji se pokazalo da su klinički parametri odgovorni za izvođenje biopsije bili brža progresija bubrežne disfunkcije, veći stupanj bubrežnog oštećenja i veća proteinurija. Kliničke karakteristike kalcineurinske nefrotoksičnosti su mala proteinurija, prazan sediment urina i sporo, ali progresivno pogoršanje bubrežne funkcije i hipertenzija [17, 122]. Iz navedenog slijedi da je u studiji više biopsija učinjeno kod bolesnika koji su se razlikovali od toga kliničkog fenotipa.

Ovakve patohistološke studije bubrega nakon transplantacije jetre općenito su rijetke [6, 7, 8, 9, 10, 11, 123], a prema broju biopsiranih bolesnika, ovo je po veličini druga do sada analizirana patohistološka serija bubrega nakon TJ [8].

Rezultati ove studije ukazuju da je u više od polovice bolesnika (57,5%) bubrežno oštećenje posljedica primjene kalcineurinskih inhibitora, u 24,2% primarne bolesti glomerula, u 15,2% hipertenzivne nefropatije i u 3,0% akutnog tubularnog oštećenja. U najvećoj (81 nalaz) histološkoj studiji, nedavno su Kim JY i suradnici na populaciji transplantiranih bolesnika (51% HCV-pozitivnih) prikazali etiologiju KBB koju su u 42% slučajeva činile primarne bolesti glomerula, a u 16% slučajeva kalcineurinska nefrotoksičnost [8]. Naša populacija se prema etiologiji bolesti jetre razlikuje u odnosu na njihovu tako da nije moguće komparirati rezultate te dvije studije. Na manjem uzorku populacije slične našoj, O’Riordan i suradnici su dokazali kalcineurinsku nefrotoksičnost u 46% slučajeva KBB [7].

Naši bolesnici s CNI nefropatijom imali su veću negativnu promjenu eGFR u kraćem razdoblju nakon transplantacije, za razliku od npr. hipertenzivne nefropatije, kod koje se u ranom razdoblju nakon transplantacije bubrežna funkcija manje mijenjala, odnosno poboljšala se u odnosu na vrijednost prije TJ. Također je zanimljivo je da nije bilo značajne korelacije između eGFR u trenutku biopsije i stupnja intersticijske fibroze i tubularne atrofije, što govori da je kod ovih bolesnika u znatnoj mjeri prisutna funkcionalna komponenta bubrežne disfunkcije, izazvana vazokonstriktorskim učinkom CNI. Prediktivna vrijednost ove histološko-funkcionalne diskrepancije za mogući oporavak od KBB predstavlja predmet daljnjeg istraživanja u našoj ustanovi.

Razvitak kronične CNI nefropatije nije u potpunosti jasan, a do danas je predloženo nekoliko mehanizama nastanka. Smatra se da direktni mehanizam uključuje učinak ROS-a koji dovodi do oštećenja endotelne funkcije [37, 44, 49], te brojne citokine, TGF- β , matriks metaloproteinazu-9 i PDGF koji dovode do fibrogeze [38, 50, 51]. TGF- β svojim djelovanjem blokira proliferaciju T-limfocita, ali istovremeno potiče angiogenezu i proliferaciju fibroblasta što dovodi do razvoja fibroze [52]. Smatra se također da patološku ulogu ima i disregulacija RAAS-a, budući da kalcineurinski inhibitori povećavaju transkripciju receptora za angiotenzin II [53]. U svom radu Gallon i suradnici pokazali su da je D/D fenotip ACE gena povezan s povećanim rizikom za razvitak CNI nefropatije [54]. Posljedično tome razvijaju se histopatološke slike kalcineurinske nefropatije, koje uključuju prugastu intersticijsku fibrozu (eng. *striped*), nodularnu arterijalnu hijalinozu s razvitkom

obliterirajuće arteriolopatije, vakuolizaciju tubula, te kasnije promjene u obliku tubularne atrofije, ishemijskog kolapsa glomerula i razvitka globalne i fokalne glomeruloskleroze [6, 12, 40]. Neprepoznata kronična TMA također je jedan od predloženih mehanizama razvitka kronične CNI nefropatije, budući da CNI dovode do direktne toksične ozljede endotela i induciraju vazokonstrikciju mikrovaskulature i agregaciju trombocita [6, 44, 55, 124]. Brojni radovi pokazuju da su kalcineurinski inhibitori najčešći uzrok postransplantacijske TMA [44, 125, 126, 124, 127, 128, 129], iako virusne infekcije (HCV, HBC, HIV i PVB19) samostalno, a osobito u kombinaciji s CNI, mogu pogodovati njezinom nastanku [130, 131, 132, 133]. U našoj studiji svi bolesnici (n=3) koji su razvili TMA liječeni su jednim od CNI-a, a dva bolesnika imali su pridruženu virusnu infekciju (1 bolesnik HCV, 1 bolesnik HBV), bez znakova glomerulonefritisa na bioptičkom uzorku.

Iako se posttransplantacijska KBB u praksi često olako pripisuje nefrotoksičnom učinku CNI, 40% preostalih histoloških entiteta upućuje na multifaktorijalnost postransplantacijske kronične bubrežne bolesti i time naglašava neophodnost histološke evaulacije u svrhu adekvatnog pristupa liječenju.

Zaključno, rezultati ove studije ukazuju na veliku incidenciju KBB nakon TJ, koja je u našoj kohorti bolesnika najčešće posljedica imunosupresivne terapije kalcineurinskim inhibitorima. Nefrotoksičnost kalcineurinskih inhibitora se razvila, iako je kod većine bolesnika u fazi održavanja bila primjenjena dualna imunosupresivna terapija s MPA s ciljem smanjenja nuspojava CNI-a. Budući da kod skupine bolesnika sa kalcineurinskom nefrotoksičnošću u studiji ne postoji dobra korelacija između glomerularne filtracije i stupnja intersticijske fibroze i tubularne atrofije, postoji mogućnost da bi niske glomerularne filtracije dijelom mogle biti posljedica i reverzibilnih učinaka kalcineurinskih inhibitora (vazokonstrikcije) te ukoliko se dovoljno rano uoče modifikacijom imunosupresivnog protokola moguće bi bilo prevenirati daljnje pogoršanje bubrežne funkcije. S obzirom na to potrebno je evaulirati imunosupresivne protokole s nižom ekspozicijom kalcineurinskih inhibitora.

Najčešća strategija minimalizacije kalcineurinskih inhibitora uključuje uvođenje MPA ili mTOR u imunosupresivne protokole, čime se nastoji smanjiti njihov direktni nefrotoksični učinak i reducirati indirektni učinak smanjem rizika za razvitak metaboličkog sindroma. Brojne studije su

pokazale da protokoli s poštrednom primjenom kalcineurinskih inhibitora sa MPA ili mTOR inhibitorom mogu potencijalno poboljšati bubrežnu funkciju [19, 20, 61, 62, 63, 64, 91, 134]. Učinak na bubrežnu funkciju kod novotransplantiranih bolesnika ukidanjem kalcineurinskih inhibitora te zamjenom sa mTORinhibitorom i novijim molekulama poput selektivnog inhibitora C-kinaze, sotrastaurina i selektivnog kostimuacijskog inhibitora, betalacepta trenutno se evaluira u kliničkim studijama [93, 94, 95, 96, 97].

Ova studija nije uspjela u pokušaju definiranja kliničko-patoloških skupina neinvazivnim testovima, tako da biopsija i dalje ostaje standard za etiološku dijagnozu bubrežne bolesti u ovih bolesnika. Smatramo da prag za biopsiju bubrega u ovih bolesnika treba biti nizak, jer se time omogućuje etiološka terapija odnosno individualiziranje imunosupresije sukladno patohistološkom nalazu, dok još kronične histološke promjene u bubrezima nisu uznapredovale.

6 ZAKLJUČCI

- Kumulativna incidencija novonastale KBB nakon transplantacije jetre je visoka u našoj kohorti bolesnika te iznosi 54,5% za 12 mj, za 58,9% za 24 mj. 63,6 % za 36 mj. i 69,7%. za 48 mj.
- Dužim razdobljem praćenja može se očekivati povećanje učestalosti uznapredovale KBB odnosno potreba za bubrežnim nadomjesnim liječenjem u značajnog broja bolesnika.
- Veličina pada eGFR tijekom prvog mjeseca nakon transplantacije pozitivno korelira s veličinom eGFR prije transplantacije.
- Neovisni čimbenici rizika za razvoj KBB na ispitivanoj kohorti su: dob bolesnika, infekcija virusom hepatitisa C, te stupanj bubrežne funkcije prije transplantacije kao i stupanj bubrežne funkcije u 1. mjesecu nakon transplantacije jetre.
- U više od polovice bolesnika (57,5%) bubrežno oštećenje posljedica je primjene kalcineurinskih inhibitora, u 24,2% primarne bolesti glomerula, a u 15,2% hipertenzivne nefropatije.
- Kod bolesnika s KBB općenito, kao ni kod bolesnika s kalcineurinskom nefrotoksičnošću ne postoji dobra korelacija između glomerularne filtracije i stupnja intersticijske fibroze i tubularne atrofije. Stoga bi niske glomerularne filtracije dijelom mogle biti posljedica reverzibilnih (vazokonstriktorskih) učinaka kalcineurinskih inhibitora.
- Prag za biopsiju bubrega kod bubrežne disfunkcije nakon transplantacije jetre treba biti nizak, jer se time omogućuje etiološka terapija dok kronične histološke promjene u bubrezima nisu još uznapredovale.
- S obzirom na predominantnu kalcineurinsku nefrotoksičnost kod razvoja KBB nakon transplantacije jetre potrebno je evaluirati imunosupresivne protokole s nižom ekspozicijom kalcineurinskih inhibitora.

7 SAŽETAK

Uvod: Kronična bubrežna bolest (KBB) značajna je komplikacija transplantacije jetre (TJ), koja utječe na morbiditet i mortalitet bolesnika nakon transplantacije. Stoga je važno identificirati i modificirati faktore rizika koji negativno utječu na bubrežnu funkciju. Hipoteza disertacije bila je da je KBB česta nakon TJ i da je vodeći uzročni čimbenik nefrotoksičnost kalcineurinskih inhibitora. Ciljevi ovog rada bili su odrediti incidenciju novonastale KBB, identificirati faktore rizike, istražiti klinički tijek, te odrediti etiologiju novonastale KBB kod bolesnika nakon TJ.

Metode: Analizirano je 197 bolesnika kojima je u KB Merkur transplantirana jetra u razdoblju od 2005. do 2010. godine, koji nisu imali KBB prije TJ. KBB nakon TJ definirana je procijenjenom glomerularnom filtracijom (eGFR) $<60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ u trajanju od najmanje 3 mjeseca, koristeći Modification in Renal Disease (MDRD) formulu.

Rezultati: Većina bolesnika (50,3%) transplantirana je zbog alkoholne bolesti jetre. Veličina eGFR prije TJ pozitivno je korelirala s veličinom pada eGFR nakon TJ, tako da su veći pad doživjeli bolesnici s višom eGFR prije transplantacije. Prosječna eGFR svih bolesnika pogoršala se nakon transplantacije. Kumulativna incidencija novonastale KBB nakon TJ iznosila je 54,5% nakon 12 mj., 58,9% nakon 24 mj., 63,6 % nakon 36 mj. i 69,7%. nakon 48 mj. Multivarijatna analiza pokazala je da su neovisni čimbenici rizika za razvoj KBB nakon TJ: starija dob bolesnika, infekcija virusom hepatitisa C, stupanj bubrežne funkcije prije TJ i stupanj bubrežne funkcije u 1. mj. nakon TJ. Patohistološkom analizom 33 bioptička uzorka bubrega bolesnika s KBB nakon TJ, više od polovice bolesnika (57,5%) imalo je kalcineurinsku (CNI) nefrotoksičnost, 24,2% primarnu bolest glomerula, a 15,2% hipertenzivnu nefropatiju. Kod bolesnika s KBB općenito, kao ni kod bolesnika s CNI nefrotoksičnošću nije nađena korelacija između eGFR i stupnja intersticijske fibroze i tubularne atrofije (IF/TA).

Zaključak: KBB je česta nakon TJ, a CNI nefrotoksičnost je njezin vodeći uzrok. S obzirom na izostanak korelacije između IF/TA i eGFR, značajna komponenta bubrežne disfunkcije je funkcionalna (vjerojatno vazokonstriksijski učinak CNI). Dužim razdobljem praćenja može se očekivati daljnje povećanje učestalosti uznapredovalih stadija KBB nakon TJ, odnosno potreba za

bubrežnim nadomjesnim liječenjem u značajnog broja bolesnika. Biopsija bubrega je nezamjenjivi alat u rasvjetljavanju etiologije KBB nakon TJ. Potrebno ju je rano uvrstiti u dijagnostičke algoritme bubrežne disfunkcije nakon TJ, jer se time omogućuje etiološka terapija, dok još kronične histološke promjene u bubrezima nisu uznapredovale. S obzirom na CNI nefrotoksičnost kao vodeći uzrok KBB nakon TJ, potrebno je evaluirati imunosupresivne protokole s nižom ekspozicijom CNI-a.

8 SUMMARY

Chronic Kidney Disease after Liver Transplantation: Risk Factors and Etiology

Background: Chronic kidney disease (CKD) is a significant complication after liver transplantation (LT) which affects patients' survival. Therefore it is important to identify and influence risk factors that negatively affect kidney function. Hypothesis of the thesis is that CKD is frequent after LT and that calcineurin inhibitors (CNIs) are the major leading cause. The goals of this study were to determine incidence of newly developed CKD, to identify the risk factors, to investigate clinical course and to determine the etiology of CKD after LT.

Methods: Hundred and ninety seven liver recipients without preexisting CKD transplanted in KB Merkur between 2005. and 2010. were analyzed. CKD after LT was defined as decreased estimated glomerular filtration rate (eGFR) $<60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ for at least three consecutive months using Modification in Renal Disease (MDRD) formula.

Results: Majority of recipients (50,3%) were transplanted due to alcoholic liver cirrhosis. The level of eGFR before LT correlated positively with the eGFR decline after LT, where the decline was more pronounced in patients with higher eGFR prior to LT. The mean eGFR of all recipients significantly deteriorated after LT. Cumulative incidence of newly developed CKD for 12, 24, 36 and 48 months after LT was 54,5%, 58,9%, 63,6 % and 69,7%, respectively. A multivariate Cox regression analysis revealed that overall risk of CKD development was associated with old age of recipients, hepatitis C virus infection, the level of kidney function before LT and the level of kidney function at 1 month after LT. Pathohistological analysis of 33 kidney samples revealed in majority of patients (57,5%) CNI nephrotoxicity, in 24,2% primary glomerular disease and in 15,2% hypertensive nephropathy. No correlation was established between the eGFR and the stage of interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) in all patients with CKD, as well as patients with CNI nephrotoxicity.

Conclusion: CKD is frequent after LT, and CNI nephrotoxicity is its leading cause. Considering the lack of correlation between eGFR and IF/TA, a significant component of kidney dysfunction is

functional (possible vasoconstrictive effect of CNI). With prolonged observation, it is likely to expect the increased incidence of advanced stages of CKD after LT and the application of renal replacement therapies in significant number of patients. Kidney biopsy is an irreplaceable diagnostic method for determining the etiology of CKD after LT. It should be considered in the early phase of diagnostic algorithm for the kidney dysfunction to enable proper etiological therapy before the development of irreversible histological changes in kidneys. Considering CNIs nephrotoxicity as the major leading cause of CKD after LT, it is necessary to evaluate immunosuppressive protocols with lower CNI exposition.

9 LITERATURA

1. Ojo A, Held P, Port F, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003;349:931–940.
2. O’Riordan A, Wong V, McCormick P, Hegarty J, Watson A. Chronic kidney disease post-liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:2630-2636.
3. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;39:S1-266.
4. Galešić K, Sabljarić Matovinović M. Kronična insuficijencija bubrega. [book auth.] B Vrhovac, B Jakšić. *Interna medicina*. Zagreb : Naklada Ljevak, 2008, 1087-1091.
5. O’Riordan A, Wong V, McCormick PA, Hegarty JE, Watson AJ. Chronic kidney disease post-liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:2630–2636.
6. Pillebout E, Nochy D, Hill G, et al. Renal histopathological lesions after orthotopic liver transplantation (OLT). *Am J Transplant*. 2005;5:1120-1129.
7. O’Riordan A, Dutt N, Cairns H, et al. Renal biopsy in liver transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:2276-82.
8. Kim J, Akalin E, Dikman S, et al. The variable pathology of kidney disease after liver transplantation. *Transplantation*. 2010;89:215-21.
9. Lynn M, Abreo K, Zibari G, McDonald J. End-stage renal disease in liver transplants. *Clin Transplant*. 2001;15:66-69.
10. Dische F, Neuberger J, Keating J, Parsons V, Calne R, Williams R. Kidney pathology in liver allograft recipients after long-term treatment with cyclosporin A. *Lab Invest* . 1988;58:395-402.
11. Fisher N, Nightingale P, Gunson B, Lipkin G, Neuberger J. Chronic renal failure following liver transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation*. 1998;15:59-66.
12. Myers BD, Newton L. Cyclosporine-induced chronic nephropathy: An obliterative microvascular renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 1991;2:S45–S52.
13. Gonwa TA, Jennings L, Mai ML, Stark PC, Levey AS, Klintmalm GB. Estimation of glomerular filtration rates before and after orthotopic liver transplantation: Evaluation of current equations. *Liver Transpl*. 2004;10:301–309.
14. Nair S, Verma S, Thuluvath PJ. Pretransplant renal function predicts survival in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 2002;35:1179–1185.
15. Borrows R, Cockwell P. Measuring renal function in solid organ transplant recipients. *Transplantation*. 2007;83:529–531.

16. Porayko MK TS, Gores GJ, Richards TM, et al. Nephrotoxic effects of primary immunosuppression with FK-506 and cyclosporine regimens after liver transplantation. *Mayo Clin Proc.* 1994;69:105-11.
17. Stratta PC, Quaglia M, Balzola F, et al. Posttransplantation chronic renal damage in nonrenal transplant recipients. *Kidney Int.* 2005;68:1453-63.
18. Pham PT, Pham PC, Wilkinson AH. Management of renal dysfunction in the liver transplant recipient. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009;14:231-9.
19. Créput C, Blandin F, Derouere B, et al. Long-term effects of calcineurin inhibitor conversion to mycophenolate mofetil on renal function after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2007;13:1004-10.
20. Karie-Guigues S, Janus N, Saliba F, et al. Long-term renal function in liver transplant recipients and impact of immunosuppressive regimens (calcineurin inhibitors alone or in combination with mycophenolate mofetil): the TRY study. *Liver Transpl.* 2009 Sep;15(9):1083-91. 2009;15:Liver Transpl. 2009 Sep;15(9):1083-91.
21. Davis CL. Impact of pretransplant renal failure: When is listing for kidney-liver indicated? *Liver Transpl.* 2005;11:S35-44.
22. Guitard J, Ribes D, Kamar N, et al. Predictive factors for chronic renal failure one year after orthotopic liver transplantation. *Ren Fail.* 2006;28:419–425.
23. McGuire B, Julian B, Bynon JJ, et al. Brief communication: Glomerulonephritis in patients with hepatitis C cirrhosis undergoing liver transplantation. *Ann Intern Med.* 2006;144:735-741.
24. Tsui J, Vittinghoff E, Shlipak M, et al. Association of hepatitis C seropositivity with increased risk for developing end-stage renal disease. *Arch Intern Med.* 2007;167:1271-1276.
25. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, et al. Renal replacement therapy and orthotopic liver transplantation: The role of continuous veno-venous hemodialysis. *Transplantation.* 2001;71:1424–1428.
26. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003;17:2205-2232.
27. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme. *Nature.* 1992;357:695-7.
28. Borel JF, Kis ZL. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). *Transplant Proc.* 1991;23:1867-1874.
29. Calne RY, Rolles K, White DJ, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet.* 1979;17:1033-6.
30. Stracciari A, Guarino M. Neuropsychiatric complications of liver transplantation. *Metab Brain Dis.* 2001;16:3-11.

31. Lamas S. Cellular mechanisms of vascular injury mediated by calcineurin inhibitors. *Kidney Int.* 2005;68:898-907.
32. Webster A, Woodroffe R, Taylor R, Chapman J, Craig J. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ.* 2005;331:810.
33. Iwatsuki S, Starzl TE, Shaw BW, et al. Long-term use of cyclosporine in liver recipients. Reduction of dosages in the first year to avoid nephrotoxicity. *Transplantation.* 1983;36:641-3.
34. Gordon RD, Starzl TE. Changing perspectives on liver transplantation in 1988. *Clin Transpl.* 1988;:5-27.
35. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. *N Engl J Med.* 1994;331:1110-5.
36. Artz M, Boots J, Ligtnerberg G, et al. Improved cardiovascular risk profile and renal function in renal transplant patients after randomized conversion from cyclosporine to tacrolimus. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1880-1888.
37. Ovuworie CA, Fox ER, Chow CM, et al. Vascular endothelial function in cyclosporine and tacrolimus treated renal transplant recipients. *Transplantation.* 2001;72:1385–1388.
38. Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2002;62:2257–2263.
39. Lanese DM, Conquer JD. Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. *J Clin Invest.* 1993;91:2144-2149.
40. Sis B, Dadras F, Khoshjou F, Cockfield S, Mihatsch MJ, Solez K. Reproducibility studies on arteriolar hyaline thickening scoring in calcineurin inhibitor-treated renal allograft recipients. *Am J Transplant.* 2006;6:1444-1450.
41. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perloth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med.* 1984;311:699-705.
42. Ruggenenti P, Perico N, Mosconi L, Gaspari F, Benigni A, Amuchastegui CS. Calcium channel blockers protect transplant patients from cyclosporine-induced daily renal hypoperfusion. *Kidney Int.* 1993;43:706-711.
43. De Nicola L, Thompson S, Wead L, al e. Arginine feeding modifies cyclosporine nephrotoxicity in rats. *J Clin Invest.* 1993;92:1859.
44. Lamas S. Cellular mechanisms of vascular injury mediated by calcineurin inhibitors. *Kidney Int.* 2005;68:898.

45. Ramzy D, Rao V, Tumati L, et al. Role of endothelin-1 and nitric oxide bioavailability in transplant-related vascular injury: comparative effects of rapamycin and cyclosporine. *Circulation*. 2006;114:I214-9.
46. Fellstrom B. Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc*. 2004;36:220S–223S.
47. Binet I, Wallnofer A, Weber C, Jones R, Thiel G. Renal hemodynamics and pharmacokinetics of bosentan with and without cyclosporine A. *Kidney Int*. 2000;57:224–231.
48. Gaston RS. Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity: reflections on an evolving paradigm. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:2029-34.
49. Moreno JM, Ruiz MC, Ruiz N, et al. Modulation factors of oxidative status in stable renal transplantation. *Transplant Proc*. 2005;37:1428-1430.
50. Langham RG, Egan MK, Dowling JP, Gilbert RE, Thomson NM. Transforming growth factor-beta1 and tumor growth factor-beta-inducible gene-H3 in nonrenal transplant cyclosporine nephropathy. *Transplantation*. 2001;72:1826–1829.
51. Waiser J, Dell K, Bohler T, et al. Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF-beta1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:1568–1577.
52. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Andoh TF. Pirfenidone treatment decreases transforming growth factor-beta1 and matrix proteins and ameliorates fibrosis in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Transplant*. 2002;2:111-119.
53. Avdonin PV, Cottet-Maire F, Afanasjeva GV, Loktionova SA, Lhote P, Ruegg UT. Cyclosporine A up-regulates angiotensin II receptors and calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*. 1999;55:2407–2414.
54. Gallon L, Akalin E, Lynch P, et al. ACE gene D/D genotype as a risk factor for chronic nephrotoxicity from calcineurin inhibitors in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2006;81:463–468.
55. Zarifian A, Meleg-Smith S, O'Donovan R, Tesi RJ, Batuman V. Cyclosporine-associated thrombotic microangiopathy in renal allografts. *Kidney Int*. 1999;55:2457–2466.
56. Margreiter R. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporine microemulsion in renal transplantation: A randomised multicentre study. *Lancet*. 2002;359:741–746.
57. Heisel O, Heisel R, Balshaw R, Keown P. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: A systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant*. 2004;4:583–595.
58. Tamura K, Fujimura T, Tsutsumi T, et al. Transcriptional inhibition of insulin by FK506 and possible involvement of FK506 binding protein-12 in pancreatic beta-cell. 1995;59:1606–1613.
59. van Duijnhoven EM, Christiaans MH, Boots JM, Nieman FH, Wolffenbuttel BH, van Hooff JP. Glucose metabolism in the first 3 years after renal transplantation in patients receiving tacrolimus versus cyclosporine based immunosuppression. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:213–220.

60. Varghese Z, Fernando RL, Turakhia G, et al. Oxidizability of low-densitylipoproteins from Neoral and tacrolimus treated renal transplant patients. *Transplant Proc.* 1998;30:2043–2046.
61. Flechner S, Kobashigawa J, Klintmalm G. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity. *Clin Transplant.* 2008;22:1-15.
62. DuBay D, Smith RJ, Qiu KG, Levy GA, Lilly L, Therapondos G. Sirolimus in liver transplant recipients with renal dysfunction offers no advantage over low-dose calcineurin inhibitor regimens. *Liver Transpl.* 2008;14:651-9.
63. Watson CJ, Gimson AE, Alexander GJ, et al. A randomized controlled trial of late conversion from calcineurin inhibitor (CNI)-based to sirolimus-based immunosuppression in liver transplant recipients with impaired renal function. *Liver Transpl.* 2007;13:1694-702.
64. Schlitt H, Barkmann A, Böker K, et al. Replacement of calcineurin inhibitors with mycophenolate mofetil in liver-transplant patients with renal dysfunction: a randomised controlled study. *Lancet.* 2001;357:587-591.
65. Wilkinson AH, Cohen DJ. Renal failure in the recipients of nonrenal solid organ transplants. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:1136-44.
66. Broekroelofs J, Stegeman CA, Navis G, de Jong PE. Prevention of renal function loss after non-renal solid organ transplantation--how can nephrologists help to keep the kidneys out of the line of fire. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:1841-3.
67. Chan C, Maurer J, Cardella C, Cattran D, Pei Y. A randomized controlled trial of verapamil on cyclosporine nephrotoxicity in heart and lung transplant recipients. *Transplantation.* 1997;63:1435-40.
68. Rodicio JL. Calcium antagonists and renal protection from cyclosporine nephrotoxicity: long-term trial in renal transplantation patients. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35:S7-11.
69. Pichler RH, Franceschini N, Young BA, et al. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol.* 1995;6:1186-1196.
70. Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, et al. Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol.* 1995;269:491-499.
71. Post M, Raszeja-Wyszomirska J, Jarosz K, et al. Immunosuppression with low-dose daclizumab in liver transplant recipients with impaired kidney function: a single-center experience. *Transplant Proc.* 2009;41:3107-3109.
72. Emre S, Gondolessi G, Polat K, et al. Use of daclizumab as initial immunosuppression in liver transplant recipients with impaired renal function. *Liver Transpl.* 2001;7:220-225.
73. Beckebaum S, Cicinnati V, Brokalaki E, Frilling A, Gerken G, Broelsch C. CNI-sparing regimens within the liver transplant setting: experiences of a single center. *Clin Transpl.* 2004;:215-20.

74. Kornberg A, Küpper B, Hommann M, Scheele J. Introduction of MMF in conjunction with stepwise reduction of calcineurin inhibitor in stable liver transplant patients with renal dysfunction. *Int Immunopharmacol*. 2005;5:141-6.
75. Raimondo ML, Dagher L, Papatheodoridis GV, et al. Long-term mycophenolate mofetil monotherapy in combination with calcineurin inhibitors for chronic renal dysfunction after liver transplantation. *Transplantation*. 2003;75:186-90.
76. Cantarovich M, Tzimas GN, Barkun J, Deschênes M, Alpert E, Tchervenkov J. Efficacy of mycophenolate mofetil combined with very low-dose cyclosporine microemulsion in long-term liver-transplant patients with renal dysfunction. *Transplantation*. 2003;76:98-102.
77. Ferraris JR, Duca P, Prigoshin N, et al. Mycophenolate mofetil and reduced doses of cyclosporine in pediatric liver transplantation with chronic renal dysfunction: changes in the immune responses. *Pediatr Transplant*. 2004;8:454-9.
78. Herrero JI, Quiroga J, Sangro B, et al. Conversion of liver transplant recipients on cyclosporine with renal impairment to mycophenolate mofetil. *Liver Transpl Surg*. 1999;5:414-20.
79. Orlando G, Baiocchi L, Cardillo A, et al. Switch to 1.5 grams MMF monotherapy for CNI-related toxicity in liver transplantation is safe and improves renal function, dyslipidemia, and hypertension. *Liver Transpl*. 2007;13:46-54.
80. Barkmann A, Nashan B, Schmidt HH, et al. Improvement of acute and chronic renal dysfunction in liver transplant patients after substitution of calcineurin inhibitors by mycophenolate mofetil. *Transplantation*. 2000;15:1886-90.
81. Alamo JM, Barrera L, Casado MD, et al. Efficacy, tolerance, and safety of mammalian target of rapamycin inhibitors as rescue immunosuppressants in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2009;41:2181-2183.
82. Di Benedetto F, Di Sandro S, De Ruvo N, et al. Immunosuppressive switch to sirolimus in renal dysfunction after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2009;41:1297-1299.
83. Castroagudín JF, Molina E, Tomé S, Otero E, Rodríguez M, Varo E. Safety of an immunosuppressant protocol based on sirolimus in liver transplant recipients with malignancies or high risk of tumor recurrence. *Transplant Proc*. 2009;41:1003-104.
84. Nocera A, Andorno E, Tagliamacco A, et al. Sirolimus therapy in liver transplant patients: an initial experience at a single center. *Transplant Proc*. 2008;40:1950-1952.
85. Yang YJ, Chen DZ, Li LX, et al. Sirolimus-based immunosuppressive therapy in liver transplant recipient with tacrolimus-related chronic renal insufficiency. *Transplant Proc*. 2008;40:1541-4.
86. Yu S, He X, Yang L, et al. A retrospective study of conversion from tacrolimus-based to sirolimus-based immunosuppression in orthotopic liver transplant recipients. *Exp Clin Transplant*. 2008;6:113-117.

87. Shenoy S, Hardinger KL, Crippin J, et al. Sirolimus conversion in liver transplant recipients with renal dysfunction: a prospective, randomized, single-center trial. *Transplantation*. 2007;83:1389-1392.
88. Donckier V, Craciun L, Lucidi V, et al. Acute liver transplant rejection upon immunosuppression withdrawal in a tolerance induction trial: potential role of IFN-gamma-secreting CD8⁺ T cells. *Transplantation*. 2009;87:S91-5.
89. Toso C, Merani S, Bigam DL, Shapiro AM, Kneteman NM. Sirolimus-based immunosuppression is associated with increased survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010;51:1237-1243.
90. Vivarelli M, Vetrone G, Zanello M, et al. Sirolimus as the main immunosuppressant in the early postoperative period following liver transplantation: a report of six cases and review of the literature. *Transpl Int*. 2006;19:1022-1025.
91. Fairbanks KD, Eustace JA, Fine D, Thuluvath PJ. Renal function improves in liver transplant recipients when switched from a calcineurin inhibitor to sirolimus. *Liver Transpl*. 2003;9:1079-1085.
92. Shenoy S, Hardinger KL, Crippin J, et al. Sirolimus conversion in liver transplant recipients with renal dysfunction: a prospective, randomized, single-center trial. *Transplantation*. 2007;83:1389-1392.
93. De Simone P, Metselaar H, Fischer L, et al. Conversion from a calcineurin inhibitor to everolimus therapy in maintenance liver transplant recipients: a prospective, randomized, multicenter trial. *Liver Transpl*. 2009;15:1262-1269.
94. Levy G, Schmidli H, Punch J, et al. Safety, tolerability, and efficacy of everolimus in de novo liver transplant recipients: 12- and 36-month results. *Liver Transpl*. 2006;12:1640-1648.
95. Budde K, Sommerer C, Becker T, et al. Sotrastaurin, a novel small molecule inhibiting protein kinase C: first clinical results in renal-transplant recipients. *Am J Transplant*. 2010;10:571-81.
96. <http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00555321>.
97. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01150097>.
98. Edwards E, Harper A. Application of a continuous disease severity score to the OPTN liver waiting list. *Clin Transpl*. 2001;:19-24.
99. AN INTERNATIONAL PANEL: ANTHONY J. DEMETRIS, KENNETH P. BATTS, AMAR P. DHILLON, LINDA FERRELL,. Banff Schema for Grading Liver Allograft Rejection:An International Consensus Document. *Hepatology*. 1997;25:658-663.
100. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*. 1999;130:461-470.

101. Barber K, Blackwell J, Collett D, Neuberger J, Advisory Group UK Transplant L. Life expectancy of adult liver allograft recipients in the UK. *Gut*. 2007;56:279-282.
102. Pawarode A, Fine D, Thuluvath P. Independent risk factors and natural history of renal dysfunction in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2003;9:741-747.
103. www.eltr.org.
104. Kim D, Lim C, Parasuraman R, et al. Renal disease burden following liver transplantation. *Transplant Proc*. 2006;38:3663-3665.
105. Cicinnati V, Yu Z, Klein C, et al. Clinical trial: switch to combined mycophenolate mofetil and minimal dose calcineurin inhibitor in stable liver transplant patients--assessment of renal and allograft function, cardiovascular risk factors and immune monitoring. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26:1195-1208.
106. Pöge U, Gerhardt T, Stoffel-Wagner B, Klehr H, Sauerbruch T, Woitas R. Calculation of glomerular filtration rate based on cystatin C in cirrhotic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:660-664.
107. Gonwa T, Mai M, Melton L, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation*. 2001;72:1934-1939.
108. Cohen A, Stegall M, Rosen C, et al. Chronic renal dysfunction late after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2002;8:916-921.
109. Lee J, Heo N, Joo K, et al. Risk factors for consequent kidney impairment and differential impact of liver transplantation on renal function. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:2772-2785.
110. Cabezuelo J, Ramírez P, Ríos A, et al. Risk factors of acute renal failure after liver transplantation. *Kidney Int*. 2006;69:1073-1080.
111. Sanchez E, Gonwa T, Levy M, et al. Preoperative and perioperative predictors of the need for renal replacement therapy after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 2004;78:1048-1054.
112. Alessandria C, Ozdogan O, Guevara M, et al. MELD score and clinical type predict prognosis in hepatorenal syndrome: relevance to liver transplantation. *Hepatology*. 2005;41:1282-1289.
113. Balan V, Ruppert K, Demetris AJ, et al. Long-term outcome of human leukocyte antigen mismatching in liver transplantation: results of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Hepatology* . 2008;48:878-888.
114. Neumann UP, Langrehr JM, Lang M, et al. Impact of HLA matching upon outcome after liver transplantation. *Transplant Proc* . 2002;34:1499-1500.

115. Meyer C, Parissiadis A, Compagnon P, et al. Effect of HLA compatibility on liver transplantation: is it a predictive factor of postoperative outcome? . *Transplant Proc* . 1997;29:2332-2334.
116. Jakab SS, Navarro VJ, Colombe BW, Daskalakis C, Herrine SK, Rossi S. Human leukocyte antigen and adult living-donor liver transplantation outcomes: an analysis of the organ procurement and transplantation network database. *Liver Transpl* . 2007;13:1405-1413.
117. Hashimoto T, Sugawara Y, Makuuchi M. Impact of human leukocyte antigen mismatching on outcomes of living donor liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Liver Transpl*. 2007;13:938-939.
118. Langrehr JM, Puhl G, Bahra M, et al. Influence of donor/recipient HLA-matching on outcome and recurrence of hepatitis C after liver transplantation. . *Liver Transpl*. 2006;12:644-651.
119. Suehiro T, Shimada M, Kishikawa K, et al. Influence of HLA compatibility and lymphocyte crossmatching on acute cellular rejection following living donor adult liver transplantation. . 2005;25:1182-1188.
120. Harihara Y, Makuuchi M, Kawasaki S, et al. Influence of HLA compatibility on living-related liver transplantation. *Transplant Proc* . 2000;32:2107.
121. Lan X, Zhang MM, Pu CL, et al. Impact of human leukocyte antigen mismatching on outcomes of liver transplantation: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2010;16:3457-3464.
122. Shihab F. Cyclosporine nephropathy: pathophysiology and clinical impact. *Semin Nephrol*. 1996;16:536-547.
123. Neau-Cransac M, Morel D, Bernard P, et al. Renal failure after liver transplantation: outcome after calcineurin inhibitor withdrawal. *Clin Transplant*. 2002;16:368-373.
124. Ruggenti P. Post-transplant hemolytic-uremic syndrome. *Kidney Int*. 2002;62:1093-1104.
125. Rerolle J, Akposso K, Lerolle N, et al. Tacrolimus-induced hemolytic uremic syndrome and end-stage renal failure after liver transplantation. *Clin Transplant*. ;14:262-265.
126. Singh N, Gayowski T, Marino I. Hemolytic uremic syndrome in solid-organ transplant recipients. *Transpl Int*. 1996;9:68-75.
127. Trimarchi H, Truong L, Brennan S, Gonzalez J, Suki W. FK506-associated thrombotic microangiopathy: report of two cases and review of the literature. *Transplantation*. 1999;67:539-544.
128. Oyen O, Strøm E, Midtvedt K, et al. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in renal allograft recipients with thrombotic microangiopathy/hemolytic uremic syndrome. *Am J Transplant*. 2006;6:412-418.

129. Nishi H, Hanafusa N, Kondo Y, et al. Clinical outcome of thrombotic microangiopathy after living-donor liver transplantation treated with plasma exchange therapy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006 Jul;1(4):811-9. Epub 2006 Jun 14. 2006;1:811-819.
130. Ramasubbu K, Mullick T, Koo A, et al. Thrombotic microangiopathy and cytomegalovirus in liver transplant recipients: a case-based review. *Transpl Infect Dis*. 2003;5:98-103.
131. Tamura S, Sugawara Y, Matsui Y, et al. Thrombotic microangiopathy in living-donor liver transplantation. *Transplantation*. ;80:169-175.
132. Frem G, Rennke H, Sayegh M. Late renal allograft failure secondary to thrombotic microangiopathy-human immunodeficiency virus nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 1994;4:1643-1648.
133. Murer L, Zacchello G, Bianchi D, et al. Thrombotic microangiopathy associated with parvovirus B 19 infection after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:1132-1137.
134. Fung J, Kelly D, Kadry Z, Patel-Tom K, Eghtesad B. Immunosuppression in liver transplantation: beyond calcineurin inhibitors. *Liver Transpl*. 2005;11:267-280.

10 POPIS SLIKA I TABLICA

Popis tablica

Tablica 1. Stadiji kronične bubrežne bolesti.....	2
Tablica 2. Faktori rizika za razvitak akutnog bubrežnog oštećenja.	7
Tablica 3. Tipovi operativnih zahvata.	24
Tablica 4. Parametri prilikom transplantacije jetre.....	26
Tablica 5. Pridružene bolesti prije transplantacije jetre.....	26
Tablica 6. Pridruženi malignomi prije transplantacije jetre.....	27
Tablica 7. Parametri prije transplantacije jetre.	27
Tablica 8. HLA nepodudarnost primatelja i donora.	28
Tablica 9. Imunosupresivna terapija.....	29
Tablica 10. Akutno nadomjesno bubrežno liječenje (ANBL) poslije transplantacije.....	30
Tablica 11. Kumulativno preživljenje bolesnika.	31
Tablica 12. Kumulativno preživljenje grafta.	31
Tablica 13. Analiza urina nakon transplantacije.....	42
Tablica 14. Kumulativna incidencija kronične bubrežne bolesti prema dijagnostičkoj skupini.	43
Tablica 15. Rezultati univarijatne analize pojedinačnih faktora rizika za razvoj KBB nakon transplantacije jetre.	46
Tablica 16. Coxova multivarijatna analiza povezanosti faktora rizika za razvoj kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre.....	47
Tablica 17. Parametri bolesnika sa kroničnom bolesti bubrega s biopsijom bubrega i bez biopsije bubrega.....	49
Tablica 18. Patohistološke dijagnoze bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre.....	52
Tablica 19. Patohistološke kategorije bolesnika.....	53

Popis slika

Slika 1. Shematski prikaz djelovanja kalcineurinskih inhibitora. Kompleks CNI sa citoplazmatskim proteinima inhibira kalcineurin i dovodi do smanjene proliferacije T-limfocita.	8
Slika 2. Shematski prikaz bubrežnog oštećenja nakon primjene CNI.	10
Slika 3. Mehanizam nastanka akutnog bubrežnog oštećenja uzrokovanog CNI.	11
Slika 4 Uloga TGF- β u razvitku kroničnog bubrežnog oštećenja.	12
Slika 5. Mehanizam nastanka kroničnog bubrežnog oštećenja nakon primjene kalcineurinskih inhibitora.	13
Slika 6. Dijagnostičke skupine bolesnika.	25
Slika 7. Ovisnost odbacivanja jetre (AOJ) dokazanog biopsijom i tkivne nepodudarnosti ($p=n.s$).	29
Slika 8. Kumulativno preživljenje svih bolesnika nakon transplantacije jetre (Kaplan Meier analiza preživljenja).	32
Slika 9. Kumulativno preživljenje bolesnika prema dijagnostičkim skupinama (Kaplan Meier analiza preživljenja).	32
Slika 10. Kumulativno preživljenje svih presađaka (Kaplan Meier analiza preživljenja).	33
Slika 11. Kumulativno preživljenje presađaka prema dijagnostičkim skupinama (Kaplan Meier analiza preživljenja).	33
Slika 12. a) Veličina glomerularne filtracije eGFR (mL/min/1.73m^2) i b) recipročna vrijednost kreatinina ($1/K$) u serumu ($\text{L}/\mu\text{mol}$) kod svih bolesnika u studiji.	34
Slika 13. Srednja vrijednost eGFR (mL/min/1.73 m^2) prema MDRD formuli prije i poslije transplantacije jetre kod bolesnika prema dijagnostičkim skupinama. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti $\pm$ SD. ..	35
Slika 14. Srednje vrijednosti eGFR (ml/min/1.73m^2) u 24 mjesecu nakon transplantacije jetre prema dijagnostičkim skupinama. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti $\pm$ SD.	36
Slika 15. Kretanje promjene glomerularne filtracije u odnosu na glomerularnu filtraciju prije transplantacije u 1 - 48 mjesecu nakon transplantacije kod a) svih bolesnika i b) prema dijagnozama jetrene bolesti. Vrijednosti su prikazane kao srednje vrijednosti $\pm$ SD.	37
Slika 16. Odnos glomerularne filtracije prije transplantacije i prosječne promjene glomerularne filtracije od 1. do 48. mjeseca nakon transplantacije.	38
Slika 17. Zastupljenost stadija bubrežnog oštećenja kod svih bolesnika prema periodima nakon transplantacije jetre.	40
Slika 18. Zastupljenost pojedinih stadija bubrežnog oštećenja u periodima nakon transplantacije jetre prema dijagnostičkim skupinama (*virusne u odnosu na kolestatske bolesti jetre, $p<0,05$)	41
Slika 19. Kumulativna incidencija kronične bubrežne bolesti ($\text{eGFR}<60 \text{ ml/min/1.73m}^2$) nakon transplantacije jetre kod svih bolesnika.	44
Slika 20. Kumulativna incidencija kronične bubrežne bolesti nakon transplantacije jetre prema dijagnostičkim skupinama.	44

Slika 21. Kretanje bubrežne funkcije u pojedinačnoj skupini nakon transplantacije i razlike prosječne eGFR ($\mu\text{mol/L/1,73 m}^2$) između skupina bolesnika.	51
Slika 22. Prosječna eGFR prije transplantacije prema histološkim skupinama (p=n.s.).	54
Slika 23. Kretanje bubrežne funkcije nakon transplantacije u tri etiološko-dijagnostičke skupine.	55
Slika 24. Stupnjevi intersticijske fibroze i tubularne (IF/TA) atrofije kod histoloških skupina (p=n.s.)	56
Slika 25. Korelacija stupnja intersticijske fibroze i tubularne atrofije kod svih bioptiranih bolesnika (p=n.s.)....	57
Slika 26. Kalcineurinska nefrotoksičnost: sa izometričkom vakuolizacijom tubularnog epitela (strelica) i fibrozom (F) intersticija (Masson trikrom, x400 povećanje).	58
Slika 27. Trombotska mikroangiopatija: glomerul s mezangiolizom, dijelom zatvorenim lumenima kapilara i nabubrenim endotelom (PAS, x400 povećanje).	58
Slika 28. IgA nefropatija: glomerul s izraženim mezangijskim hipercelularitetom, segmentalnim ožiljkom i priraslicom (PAS, x400 povećanje).	59

11 POPIS SKRAĆENICA I SIMBOLA

ACE	angiotenzin konvertirajući enzim, <i>eng. angiotensin converting enzyme</i>
APACHE	<i>eng. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
C3	komponenta komplementa 3
CNI	kalcineurinski inhibitor, <i>eng. calcineurin inhibitor</i>
CsA	ciklosporin A
eGFR	procijenjena glomerularna filtracija, <i>eng. estimated glomerular filtration rate</i>
FDA	<i>eng. Food and Drug Administration</i>
FKBP12	<i>eng. FK-binding protein 12</i>
G	<i>eng. gauge</i>
GF	glomerularna filtracija
GN	glomerulonefritis
HLA	<i>eng. human leukocyte antigen</i>
HPLC	<i>eng. high performance liquid chromatography</i>
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL-2	interleukin-2
JAK3	Janus kinaza 3
KBB	kronična bubrežna bolest
MDRD	<i>eng. Modification of Diet in Renal Disease</i>
MPA	mikofenolna kiselina, <i>eng. mycophenolic acid</i>
mTOR	<i>eng. mammalian Target Of-Rapamycin</i>
NFAT	nuklearni faktor aktivirane T-stanice
NKF K/DOQUI	<i>eng. The National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative</i>
PDGF	trombocitni faktor rasta, <i>eng. platelet-derived growth factor</i>
PI-3K	fosfoinozimid -3 kinaze
RAAS	renin angiotenzin aldosteronski sustav
SD	standardna devijacija
Tac	takrolimus
TGF	transforming growth factor beta
TJ	transplantacija jetre

12 ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 1976. godine gdje sam završila osnovno i srednješkolno obrazovanje. 2000. godine diplomiram na Medicinskom fakultet u Zagrebu s odličnim prosjekom ocjena. 2001. godine kao pripravnik KB Merkur položem državni ispit pri MZSS. Od 2003. godine znanstaveni sam novak–asistent na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Od 2004.-2007. godine polazim doktorski studiji na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. 2007 godine polažem specijalistički ispit iz interne medicine pri MZSS. 2008 godine na KB Merkur započinjem subspecijalizaciju iz gastroenterologije, tijekom koje educiram se na Medizinische Hochschule Hannover iz područja hepatologije i transplantacijske medicine. 2010 godine polažem subspecijalistički ispit iz gastroenterologije pri MZSS. Kao stipendista European Society for Organ Transplantation i European Association for the Study of the Liver Diseases boravim na kraćim edukacijama iz transplantacijske medicine u Španjolskoj, Velikoj Britaniji i Italiji. Autor i koautor sam 20 radova (7 CC publikacija), 3 poglavlja u knjigama/priručnicima, te 31 kongresnog sažetka. Član sam Hrvatskog gastroenterološkog društva, European Society for Organ Transplantation, European Association for the Study of the Liver Diseases i American Association for the Study of Liver Diseases. Govorim engleski i njemački jezik.