

Hepatitis C vírus kiújulás molekulárbiológiai vonatkozásai májátültetés után, egyes klinikai tényezők kontextusában

Doktori értekezés

Dr. Zádori Gergely

Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nemes Balázs, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Kovalszky Ilona, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Gervain Judit, Ph.D., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sótonyi Péter, Ph.D., egyetemi tanár,
MTA rendes tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Oláh Attila, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Szőnyi László, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	6
3. Irodalmi háttér	7
3.1. A hepatitis C vírus epidemiológiája	7
3.2. A hepatitis C vírus szerkezete	8
3.3. A HCV által okozott akut és krónikus hepatitis kialakulásának immunológiai okai, illetve az extrahepatikus manifesztációk	10
3.4. A hepatitis C vírus kezelése	13
3.5. Májtranszplantáció a hepatitis C vírus vonatkozásában	15
3.5.1. A hepatitis C vírus kiújulása májátültetés után	15
3.5.2. A hepatitis C vírus rekurrencia kezelése	19
3.5.3. A májátültetés után megjelenő (de novo) diabetes mellitus	21
3.5.4. A kiterjesztett donor szelekciós kritériumok a hepatitis C vírus vonatkozásában	23
3.5.5. Retranszplantációk a hepatitis C vírus vonatkozásában	24
3.6. A hepatitis C vírus sejtbelépésének (entry) vizsgálatához használatos modellek	24
3.7. A hepatitis C vírus belépése a hepatocytakba	28
4. Célkitűzések	39
5. Betegek és módszer	40
5.1. A donor-recipient párosítás májátültetés utáni eredményekre gyakorolt szerepe	40
5.2. A hepatitis C vírus és a májátültetés után fellépő de novo diabetes mellitus közötti kapcsolat	42
5.3. A hepatitis C vírus sejtbelépéséhez szükséges receptorok vizsgálata	45
5.3.1. RNS izolálás és RT-PCR	46
5.3.2. Immunhisztokémia	49
5.4. Statisztikai analízis	50
6. Eredmények	51
6.1. A donor-recipient párosítás hatása a májátültetés utáni eredményekre	51

6.2. A hepatitis C vírus kapcsolata a májátültetés után fellépő de novo diabetes mellitussal	53
6.3. A hepatitis C vírus sejtbelépéséhez szükséges receptorok expressziójának változása HCV rekurrencia idején, valamint az egy éves antivirális kezelés után	57
6.3.1. A CLDN-1 fehérje expresszió korrelál a fibrosis score-al	59
6.3.2. A betegek klinikai paraméterei a HCV rekurrencia idején és a kezelés befejezésekor	62
6.3.3 CLDN-1, CLDN-6, CD81 és occludin expressziók a beültetésre került donormájokban és a májátültetést követő HCV kiújulás idején vett májbiopsziákban	65
6.3.4. HCV receptor expressziók IFN-ribavirin kezelés előtt és után	68
7. Megbeszélés	71
8. Következtetések	87
9. Összefoglalás	88
9. Summary	89
10. Irodalmi hivatkozások	90
11. Saját publikációk jegyzéke	119
11.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények	119
11.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények	119
12. Köszönetnyilvánítás	121

1. Rövidítések jegyzéke

AIH - autoimmun hepatitis	ALD - alkoholos májbetegség
Apo - apolipoprotein	ASGPr - asialoglikoprotein receptor
bp - bázispár	CIT - hideg ischaemiás idő
CLDN-1 - claudin-1	CLDN-6 - claudin-6
CLDN-9 - claudin-9	CTL - cytotoxikus T-lymphocyta
CyA - cyclosporin A	DC - dendritikus sejt
DC-SIGN - dendritic cell-specific intracellular adhaesion molecule-3-grabbing non-integrin	
dCt - relatív expresszió	EDC - extended donor criteria
ER - endoplazmatikus retikulum	ERK - extracellularis szignál reguláló kináz
ETR - kezelés végi vírusválasz	EVR - korai vírusválasz
FK - tacrolimus	GAG - glükóz-aminoglikánok
GM-CSF - granulocyta-macrophag colonia stimuláló faktor	
GTP - guanozin-trifoszfát	HAI - hisztológiai aktivitási index (score)
HCC - hepatocellularis carcinoma	HCV - hepatitis C vírus
HCVcc - sejtkultúrában termelt HCV	HCV-Lp - HCV-szerű partikulum
HCVpp - HCV pseudopartikulum	HDL - high-density lipoprotein
HLA - human leukocyta antigen	HOMA - homeostasis model assesment
HS - heparán-szulfát	HTK - hisztidin-triptofán-ketoglutarát
Huh7 - human hepatoma 7 sejtvonala	HVR - hipervariábilis régió
IFG - impaired fasting glicaemia, emelkedett éhomi vércukor	
IL - interleukin	IFN - interferon
IPF - initial poor function	I/R - ischaemiás/reperfúziós károsodás
IR - inzulin-rezisztencia	IRS -inzulin receptor szubsztrát
ITBL - ischaemiás típusú epeúti károsodás	JAK - Janus kináz
JAM - junctional adhaesion molecule	LDL - low-density lipoprotein
LDL-R - low-density lipoprotein receptor	LEL - nagy extracellularis hurok
LPL - lipoprotein-lipáz	
L-SIGN - liver-specific intracellular adhaesion molecule-3-grabbing non-integrin	
LVP - lipo-viro-partikulum	MEK - mitogén-aktivált protein kináz kináz

MELD- model for end-stage liver disease	MLV- rágcsáló leukémia vírus
mTOR- mammalian target of rapamycin	NFAT- nuclear factor of activated T-cells
NK- természetes ölő sejt	NODAT- new onset diabetes mellitus
NTR- nem transzlálódó régió	OGTT- orális glükóz-tolerancia teszt
OKT3- muromonab-CD3	OLT- orthotopicus májátültetés
PBC- primer biliaris cirrhosis	PBMC- peripheral blood mononuclear cell
PKA- protein-kináz A	PNF- primary non-function
PSC- primer sclerotizáló cholangitis	Raf- proto-onkogén szerin/treonin-protein
kináz	RES- retikulo-endothelialis rendszer
RT- retranszplantáció	RVR- rapid vírusválasz
sE2- solubilis E2 glikoprotein	SEL- kicsi extracelluláris hurok
SEM- standard error of mean	sHCV- vérből izolált HCV
SRB1- scavenger receptor B 1	STAT- szignál transzducer és transzkripció
aktivátor	SVR- tartós vírusmentesség
T-DM- tranziens diabetes mellitus	Th sejtek- T helper lymphocytá
TMD- transmembran domain	TNF- tumor necrosis faktor
UNOS- United Network for Organ Sharing	
uPA-SCID- urokináz plazminogén aktivátor- súlyos kombinált immundeficiencia	
UPR- unfolded protein response	UW- University of Wisconsin
VLDL- very low-density lipoprotein	WIT- meleg ischaemiás idő
ZAK- zonula occludens asszociált protein kináz	
ZO- zonula occludens	

2. Bevezetés

A májátültetés leggyakoribb indikációja szinte valamennyi transzplantációs központban a hepatitis C vírus (HCV) fertőzés által okozott májcirrhosis. A HCV miatt végzett májátültetés után a vírus kiújulása biztosan bekövetkezik, és csak idő kérdése. Ez komoly problémát jelent, mert a kiújulás klinikai kórlefolyása lehet jóindulatú (évekig/évtizedekig tartó), de lehet gyors is, mely progresszíven cholestasishoz és májelégtelenséghez vezet.

Ezért lényeges kérdés az, hogy vajon már a donorválasztás befolyásolja-e a későbbi kimenetelt a HCV tekintetében. Ugyancsak kiemelt probléma annak eldöntése, hogy vajon előre lehet-e jelezni, hogy kinél, mikor, és milyen módon újul ki a HCV, ennek ugyanis terápiás következményei vannak.

Munkám során azzal foglalkoztam, hogy vannak-e klinikai jelei, prediktív faktorai a HCV kiújulásnak. Emellett részletes molekulárbiológiai vizsgálatokat végeztem annak eldöntésére, hogy vajon lehet-e különbséget tenni a HCV kiújulás kórlefolyása és az alkalmazott antivirális kezelés sikeressége tekintetében a sejtszintű vizsgálatok eredménye alapján.

Az első témában retrospektív módon elemeztem azt, hogy a májátültetés után kialakuló de novo diabetes valóban jelzi-e a víruskiújulást, illetve munkacsoportunk vizsgálta, hogy vajon a donor- recipiens párosítás hatással van-e a későbbi eredményekre. Ezt a két témát röviden ismertetem, az eddig elért eredmények bemutatásával.

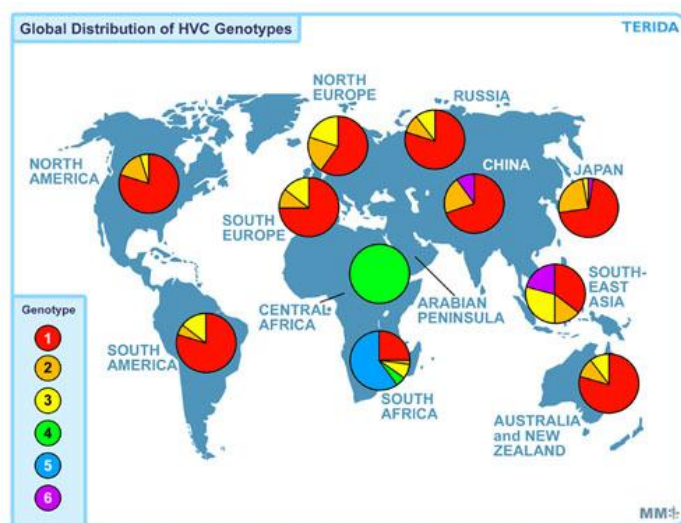
A második területet, annak tudományos igénye miatt bővebben fejtem ki. Ebben a kutatásban a májátültetésen átesett betegek májbiopsziás mintáiban, valamint beültetésre került donormájából vett ékbiopsziákban vizsgáltam a HCV sejtbelépéséhez szükséges receptorok expresszióinak változását a HCV kiújulásakor és az antivirális kezelés után.

3. Irodalmi háttér

3.1. A hepatitis C vírus epidemiológiája:

A hepatitis C vírus jelentősége abban rejlik, hogy világszerte rendkívül magas a népesség fertőzöttsége (kb. 170 millió fertőzött a Földön és kb. 100.000 vírushordozó hazánkban (1-3)), és az általa okozott betegség sokszor igen súlyos, akár fatális kimenetelű is lehet. Amennyiben a szervezet nem tudja eradikálni a vírust és krónikus infekció alakul ki, úgy a beteg várható élettartama kb. 8-12 évvel kevesebb, mint a HCV-vel nem fertőződött embereké (4). Az infekció leggyakoribb okai a fertőzött beteg vérével való kontamináció (vérkészítmények transfúziója során, intravénás droghasználat kapcsán, hemodialízis során), a szexuális úton történő infekció, illetve előfordulhat transzplacentáris terjedés is (összefoglalva (5;6). A vírus genotípusok prevalenciáját a Földön az 1. ábra mutatja. Az 1-es, 2-es és 3-as genotípusok világszerte elterjedtek, míg az 5-ös és 6-os genotípusok csak bizonyos régiókban találhatók meg, többnyire Afrikában (összefoglalva (7)). Európában az 1b és 2 genotípusok széles körben elterjedtek, elsősorban az idősebb korosztályban, ellenben az intravénás drog használók körében a 3a és 1a genotípusok fordulnak elő gyakrabban (8;9). Hazánkban az esetek 90%-ban az 1-es genotípus okozza az infekciót, azon belül is túlnyomó többségben az 1b (10).

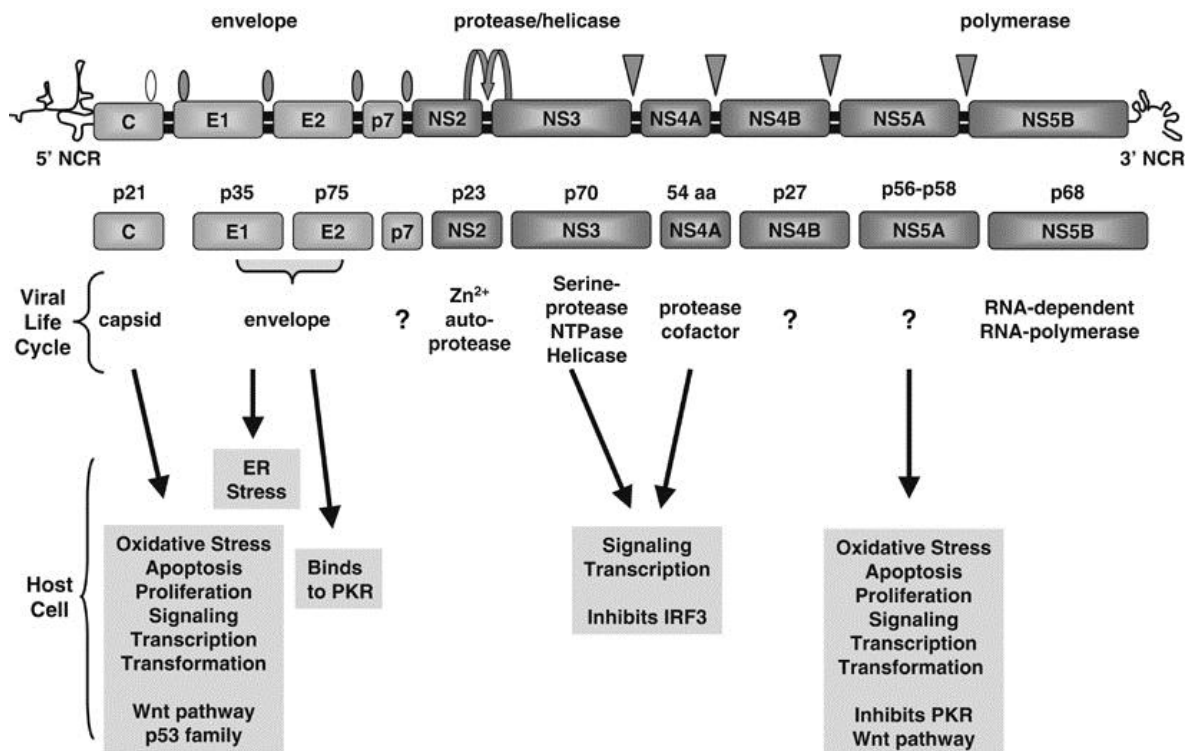
1. ábra- A hepatitis C vírus világ prevalenciája (forrás: www.ontariohepatitistreatment.com)



3.2. A hepatitis C vírus szerkezete:

A hepatitis C vírus egy kb. 9600 nucleotide hosszúságú egyszálú RNS vírus (2. ábra), mely a Flaviviridae családba tartozó Hepacivirus genus egyik tagja. 1989-ben izolálták először és gyorsan bebizonyosodott, hogy a korábban non-A, non-B hepatitisnek nevezett krónikus májgyulladás kórokozója (11;12).

2. ábra- A hepatitis C vírus (HCV) szerkezete (forrás: www.nature.com)



A HCV genom tartalmaz egy ún. „open reading frame”-t, mely az átíró géneket tartalmazza, illetve az RNS szál 5'- és 3' végén található nem transzlálódó (nem kódoló) régiókat (NTR) (13), melyek a vírus genom replikációját szabályozzák (14;15).

Az open reading frame transzlációja egy kb. 3000 aminosav hosszúságú polipeptin láncot eredményez, melyet virális és gazdasejt proteázok strukturális és non-strukturális fehérjékre hasítanak mind az átírás alatt, mind közvetlenül utána (összefoglalva (16)). A strukturális fehérjék a vírus nukleokapszidot és envelope borítását alkotják (core, E1, E2, p7), a non-strukturálisak (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) a vírus replikáció szabályozói.

A core protein nemcsak vázát alkotja a vírus partikulumnak, de sejt regulációs szerepe is van, többek között az apoptózis szabályozása (17). Az E1 és E2 envelope fehérjék

glikoproteinek, a vírus gazdasejtbe történő kapcsolódásában és sejtbe jutásában (entry) kulcsszerepet játszanak (összefoglalva (18;19)). Mindkét fehérje ún. I-es típusú transzmembran fehérje, egy N-terminális ectodomain és egy rövid C-terminális transzmembran domain (TMD) alkotja őket. A két envelope fehérje heterodimert alkot, melyben a kovalens kapcsolódást diszulfid hidak biztosítják (20;21). Az ectodomainek segítségével kötődik az E1-E2 komplex a gazdasejt plazmamembránjának azon célmolekuláihoz, mely révén be tud lépni a sejtbe (lsd. később). Továbbá kulcsfontosságúak az entry során létrejövő membránfúzióban (22;23), emellett, mivel nagymértékben glikozilált régiók, szerepük van a gazdaszervezet immunválaszának elkerülésében is (24). Az E2 glikoprotein N-terminális végén található, 27 aminosav hosszúságú hipervariábilis régió 1 (HVR 1) szerepe szintén sokrétű. Amellett, hogy a vírus partikulum egyik váz komponense, szerepe van a HCV sejtbe jutásában (lsd. később), a vírus partikulumok összerendezésében és sejtbe történő kiszabadulásában, illetve a membrán fúzióban is (25).

A non-strukturális fehérjék közül az NS2 és NS3 proteázok (utóbbi aktiválásához az NS4A, mint kofaktor szükséges), melyek a poliprotein lánc co-, és posttranszlációs hasításában vesznek részt (26;27). A HCV strukturális és non-strukturális fehérjéi egyaránt modulálják a gazdaszervezet immunrendszerét és így nemcsak a krónikus fertőzés létrejöttében, hanem a fertőzés következtében létrejövő immunszuppresszióban is szerepük van (28).

A vírus replikációja egy ún. ribonukleoprotein komplexben történik a gazdasejt endoplazmatikus retikulum (ER) rendszerével szoros asszociációban, a képződő poliprotein az ER membránja által határolt intracelluláris térbe kerül (29). Ebben a folyamatban kulcsszerepet játszanak az NS4B, NS5A és NS5B non-strukturális fehérjék, melyek közül az NS5B egy RNS-dependens RNS polimeráz (16). A poliprotein lánc, miközben az ER lumenbe transzlokálódik szinte azonnal hasítódik is a már említett strukturális és non-strukturális fehérjékre. A gazdasejt homeosztázisa szempontjából kulcsfontosságú a HCV strukturális fehérjéinek konformáció változása az ER-ben (érés, „folding”), ugyanis a nem megfelelően csomagolt és rendkívüli mennyiségben termelt vírus fehérjék (elsősorban az E1-E2 glikoproteinek, melyek dimerizálódnak is az érés folyamata alatt) a sejt számára gyakran végzetes endoplazmatikus stressz reakciót váltanak ki („unfolded protein response”-UPR)

(30;31). Ennek során részben a hibásan csomagolt fehérjék konformáció változását katalizáló fehérjék (glucose-related proteinek/heat shock proteinek/chaperonok) hatására, részben a sejt Ca homeosztázisának felborulása miatt egy sor jelátviteli út aktiválódik, melyek a noxa súlyosságának függvényében a sejt apoptózisához vezethetnek (31).

A HCV genom rendkívül változékony, a replikáció során nagyon gyakoriak a mutációk, ezért még az egy beteg vérében keringő HCV partikulumok is jelentős mértékben eltérhetnek egymástól strukturális szempontból (32). Az RNS szál legstabilabb része a core proteint kódoló nukleotide szekvencia, a leginkább variábilis pedig a már korábban tárgyalt HVR 1 (33). Mindezek alapján a hepatitis C vírust 6 genotípusba és több, mint 100 szubtípusba osztják (34), melyek különböznek mind epidemiológiai szempontból, mind a gyógyszeres kezelésre adott válaszban (ld. később). A genotípusok számozása (1-től 6-ig), és a szubtípusok osztályozása (a, b, c) aszerint történt, hogy a különböző variánsokat mikor izolálták (34). Az egyes genotípusok poliprotein láncának aminosav szekvenciája akár 30%-ban is eltérhet egymástól.

3.3. A HCV által okozott akut és krónikus hepatitis kialakulásának immunológiai okai, illetve az extrahepatikus manifesztációk:

A hepatitis C vírus hepatotrop vírus, replikációja a májban történik és ennek következtében az esetek 65-80%-ban krónikus hepatitist okoz (összefoglalva (3)). Az esetek 20%-ban spontán gyógyulás következhet be, melyre fiatal nőbetegek esetén van nagyobb esély (összefoglalva (35)).

Számos extrahepatikus betegség társulhat a HCV infekcióhoz, úgymint kevert cryoglobulinaemia; ehhez társult vagy ettől független glomerulonephritis; lymphoproliferatív betegségek (elsősorban B-sejtes non-Hodgkin lymphomák); Sjögren-sicca syndroma; polyarthralgia és arthritis (társulhatnak kevert cryoglobulinaemiához is; többségében reuma faktor pozitivitást lehet észlelni); depresszió; kognitív zavarok és fáradtság (utóbbi szintén lehet a kevert cryoglobulinaemia részjelensége); inzulin rezisztencia-II. típusú diabetes mellitus (összefoglalva (36)). Az inzulin rezisztencia súlyosbítja a HCV okozta májfibrosis

súlyosságát (37;38), valamint hátrányosan befolyásolja az antivirális kezelésre adott választ (39).

Annak ellenére, hogy a HCV a májsejtekben történő replikációja során kifejezett ER stresszt vált ki, mely az esetek jelentős részében a májsejtek apoptózisához vezet (ld. korábban), a HCV mégsem mondható direkt cytopathogen kórokozónak, az általa okozott májkárosodást a gazdaszervezet immunrendszere okozza (összefoglalva (28;40)). A szervezet első válaszreakciója az infekcióra az I-es típusú interferonok (IFN α/β) termelődése a hepatocytákban és plasmacytoid dendriticus sejtekben (DC) (összefoglalva (41;42)). Az interferonok hatására egyrészt 2'-5' oligoadenilát szintetáz termelődik a sejtekben, mely részben gátolja a HCV replikációját, részben a fertőzött sejtek apoptózisához vezethet (43). Ezenkívül a human leukocytá antigén (HLA) II-es típusú fehérjéinek termelődését is elősegíti az antigén prezentáló dendriticus sejtek plazmamembránjában. A DC sejtek összekötik a természetes és szerzett immunitást. Az aktiválódott DC sejtek a természetes ölő sejteket (NK) és cytotoxikus T-lymphocytákat (CTL, CD8⁺ T-lymphocyták) aktiválják (habár az NK sejtek előzetes érzékenyítés nélkül is képesek immunválasz kialakítására), melyek lokális gyulladást váltanak ki és részben a májsejtek apoptózisát, részben lízisét okozzák, azonban tumor necrosis factor (TNF) α -t és IFN γ -t is termelnek, melyek non-cytolitikus úton képesek gátolni a vírus replikációját (összefoglalva (44)). A lízis következtében felszabaduló intracellularis molekulák hatására a DC sejtek mieloid típusa aktiválódik, melyek az NK és NKT sejtek (utóbbiak olyan T-lymphocyták, melyek NK markereket is hordoznak a plazmamembránjukban; főleg a májban találhatóak) IFN γ termelését fokozzák. Az IFN γ részben aktiválja a macrophagokat, melyek a sejttermelékek eltakarításában játszanak döntő szerepet, részben a HCV replikációját is gátolja (45). A mieloid DC sejtek érése a nyirokcsomókban fejeződik be, melyet követően naív CD4⁺ sejtek érését segítik elő a T helper 1 (Th1) lymphocyták irányában, míg a plasmacytoid DC sejtek a Th2 útvonal irányban történő differenciációt segítik elő (46). Az aktivált Th1 sejtek részben fokozzák a mieloid DC sejtek érését, részben számos citokint termelnek, pl. interleukin (IL)-2-t, TNF α -t és IFN γ -t, melyek direkt antivirális hatást fejtenek ki. Ezen felül a Th1 lymphocyták az IL-2 és IFN γ termelése révén az NK és CTL sejtek aktiválását és proliferációját is elősegítik, ezáltal fokozzák a sejtes immunitást. A Th2 sejtek IL-4, IL-5, IL-10 és IL-13 szekréciójával a humoralis immunitás erősítésében vesznek részt. A

humoralis immunitás keretein belül termelődő anti-HCV antitestek jellemzően késve, a cellularis immunitás beindulását és máj necroenzimek emelkedését követően jelennek meg a szérumban (összefoglalva (47)). Először az NS3, majd a core fehérje ellen termelt antitestek jelennek meg, később az NS4 és envelope fehérjék ellen termeltek (összefoglalva (40)). Amennyiben az infekcióra bekövetkező $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejtes válaszreakció elégtelen, úgy krónikus fertőzés jön létre.

Számos mechanizmus ismert, melyek révén a HCV képes elbújni az immunrendszer elől és a fertőzés ezáltal krónikussá válik. Ezek közé tartozik a HCV rendkívül magas mutációs rátája, mely elsősorban a HVR1 régiót érinti (ld. korábban), ezzel a humoralis immunitás keretein belül termelődő neutralizáló antitestek nem tudnak lépést tartani. A HCV NS3 fehérjéjének mutációja a Th1 sejtek háttérbe szorulását eredményezi és Th2 dominancia alakul ki, mely előnytelen a HCV infekció elleni küzdelemben (48). A HCV az NK sejtek működését gátolni tudja a természetes ölü sejtek plazmamembránjában található CD81-hez történő kötés révén, ezáltal immunszuppressziót is okoz (49). Emellett az NK sejtek mennyisége mind a perifériás vérben, mind a májban kevesebb krónikus HCV infekció esetén egészséges emberekhez képest (50). A HCV core fehérje a T-sejtek aktivációját, proliferációját és $IFN\gamma$ termelését tudja gátolni (51). Az NS4A/B fehérjék a HLA-1 molekulák kifejeződését gátolják a plazmamebránban (52). A DC sejtek érését a core és E1 fehérjéi, az $IFN\alpha$ termelést pedig és NS3 fehérjéi révén képes gátolni a HCV (53). Maga a HCV képes bejutni a DC sejtekbe a DC-SIGN-hoz történő kötés révén (54), ezt követően pedig a core, NS3, NS5A és NS5B fehérjék a DC sejtek apoptózisát tudják kiváltani (55). A T-sejtek működését gátló regulátor T-sejtek (Tr-sejtek, $CD4^+CD25^+$ T-sejtek) mennyisége szintén fokozódik krónikus HCV infekció során (56).

Amennyiben a szervezet nem tudta eradikálni a vírust és krónikus hepatitis alakult ki, úgy ennek talaján a betegek kb. 20%-ban jelentkezik máj cirrhosis a fertőzés utáni 20 éven belül, és a cirrhotikus betegek kb. 3%-ban alakul ki hepatocellularis carcinoma (HCC) (összefoglalva (57)).

3.4. A hepatitis C vírus kezelése:

Vakcina hiányában a HCV infekció kezelésének alappillére az IFN α és ribavirin használata. A terápiás dózisban alkalmazott IFN α kb. 3-4-szeresére fokozza a HCV specifikus sejtes immunitást (CD8⁺), magasabb dózisok alkalmazása esetén ez a jótékony hatás szignifikánsan gyengül (58). A ribavirin szintén a sejtes immunitást erősíti a CD4⁺ sejtek Th1/Th2 arányának Th1 felé történő eltolásával (59).

A kezelés célja a tartós vírusmentesség (sustained virological response-SVR) elérése. Az SVR definíciója: a beteg véréből 24 héttel az antivirális kezelés befejezését követően sem lehet polimeráz lánc-reakció (PCR) vizsgálattal HCV RNS-t kimutatni (legújabb definíció szerint 50 IU/ml alatti a HCV kópiaszám). A tartós vírusmentesség a beteg gyógyulását jelenti, ugyanis SVR-t követően az ismételt HCV pozitívitas kialakulása igen ritka (60).

A kezelés hatékonyságát igen jelentős mértékben befolyásolja az infekciót okozó vírus genotypusa, az SVR-t elérő betegek aránya 1b genotypusú HCV által okozott hepatitis esetén a legkevesebb, kb. 50% (61;62). A kezelés időtartamát szintén a vírus genotypusa határozza meg. 1-es és 4-es genotypus esetén 1 évig, míg 2-es és 3-as genotypus esetén fél évig kapják a betegek az antivirális kezelést (63). Az IFN α és ribavirin alkalmazásának módja szintén befolyásolja a kezelés hatékonyságát. A kombinált kezelés hatékonyabb, mint a monoterápia, egyúttal a legjobb eredményt az IFN α pegilált formájának (PEG-IFN) ribavirinnel történő együttes alkalmazása biztosítja (61;62). A pegilált interferonnak két típusát különböztetjük meg, a PEG-IFN-2a-t és 2b-t, melyek farmakokinetikailag különböznek egymástól, előbbit elég hetente egyszer adni és így is stabil vérszintet lehet elérni. A kezelés hatására bekövetkező HCV kópiaszám változás dinamikáját az SVR-en kívül még három további definícióval jelölik (64). Az első az ún. „rapid virological response-RVR”, mely a kezelés megkezdését követő 4 héten belüli HCV negativitást, vagy a vírus kópiaszám legalább 2-log-al történő csökkenését jelenti. A második az „early virological response-EVR”, mely a kezelés megkezdését követő 12 héten belüli HCV negativitást, vagy a vírus kópiaszám legalább 2-log-al történő csökkenését jelenti. A harmadik pedig az „end of treatment response-ETR”, mely a kezelés befejezésekor igazolt HCV negativitást jelenti.

Számos olyan faktor ismert, mely előrevehető a tartós vírusmentességet a kezelés során. Azok a betegek nagyobb eséllyel reagálnak jól a kezelésre és érik el a tartós vírusmentességet, akik 40 évnél fiatalabbak, 75 kg-nál alacsonyabb a súlyuk, kaukázusi rasszba tartoznak és alacsony indulási HCV kópiaszám mellett kezdik el kapni az antivirális kezelést (habár olyan közlés is napvilágot látott, melyben a kezelés előtti alacsony HCV kópiaszám nem vetítette előre az SVR-t) (61;64;65), valamint az IL-28B gén C/C genotípusával rendelkeznek (66). Az IL-28B gén IFN- λ 3-at kódol, mely (csakúgy, mint az IFN- λ 1 és IFN- λ 2) ún. III-as típusú interferon. A III-as típusú IFN-ok csakúgy, mint az I-es típusúak (IFN- α és IFN- β), virális infekciót követően termelődnek a JAK/STAT jelátviteli úton keresztül, és in vitro számos antivirális hatásuk van (67). A lambda-IFN-ok jelentősége az őket kódoló IL-28B allél fenotípusaiból a terápia hatásosságára levonható következtetéseken túl az lehet még, hogy az I-es típusú IFN-okkal szemben ezek receptorai csak limitált számú sejteken található, így terápiás alkalmazásukkal a mellékhatások csökkenthetőek a ma használatos IFN-okkal szemben (összefoglalva (68)).

A SVR-t előrevetítő virális faktorok a HCV genotípusa (1-től eltérő genotípus esetén szignifikánsan magasabb az SVR-t elérők aránya), az RVR és EVR. A tartós vírusmentesség legerősebb előrejelzője a rapid vírusválasz (RVR) (65), majd pedig a korai vírusválasz (EVR) (61). Rapid vírusválasz szignifikánsan ritkábban alakul ki 1-es, mint egyéb HCV genotípusú infekció esetén, azonban amennyiben kialakult, úgy genotípustól függetlenül az SVR aránya 80-90% (65). Tekintettel arra, hogy az RVR rendkívül fontos előrejelzője a tartós vírusmentességnek, a rapid vírusválaszra is kerestek prediktív faktorokat. Ezek közé tartozik a 2-es és 3-as HCV genotípus, fiatal életkor, alacsony indulási HCV kópiaszám, a kezelés kezdetekor csak mérsékelt máj fibrosis, valamint a férfi nem (65). Amennyiben a kezelés 12. hetére sem alakult ki HCV negativitás, vagy legalább 2-log-nyi kópiaszám csökkenés (EVR), úgy ebben az esetben a tartós vírusmentesség esélye elenyésző (61;62;65), a beteg non-respondernek minősül, és a kezelés abbahagyását mérlegelni kell (STOP szabály).

Amennyiben a beteg nem reagál jól a kezelésre (non-responder), vagy nem kaphatja az IFN kezelést, vagy a súlyos mellékhatások miatt le kell állítani a kezelést és a krónikus hepatitis mindezek következtében máj cirrhosisba progrediál, úgy a beteg egyetlen esélyét a gyógyulásra már csak a májtranszplantáció jelenti.

3.5. Májtranszplantáció a hepatitis C vírus vonatkozásában:

A HCV cirrhosis vezető indikációja a májátültetésnek (OLT) Európában, az esetek 15%-ban emiatt kerül sor OLT-re (69). Magyarországon, hasonlóan az olasz és spanyol centrumokhoz, különösen magas a HCV cirrhosis miatti májátültetések aránya, 2007-ig az összes májátültetés 37,6%-át tette ki (70). Általánosságban elmondható, hogy a hepatitis C vírus által okozott krónikus hepatitis májátültetés utáni visszatérése (HCV rekurrencia) a betegek jelentős részében bekövetkezik, és a víruskiújulás után a májbetegség rapidan progrediál, a betegek 20-30%-ban (egyres közlések szerint 50%-ban) ismételt cirrhosis alakul ki a kiújulást követő 5 éven belül (71;72).

Fentiek eredményeképp a HCV cirrhosis miatt májátültetésen átesett betegek mortalitása magasabb, mint az egyéb indikációk miatt OLT-ben részesített betegeké (73). A SE Transzplantációs és Sebészeti Klinikán 2007-ben végzett kutatás során is úgy találták, hogy a HCV cirrhosis miatt OLT-n átesett betegek kumulatív túlélése rendre alacsonyabb volt az egyéb indikáció miatt májátültetésen átesett betegekétől (1, 3 és 5 éves túlélés 73%, 67%, 56% HCV cirrhosis miatt, míg 80%, 74% és 70% más indikáció miatt történt OLT esetén, $p < 0,05$) (70).

3.5.1. A hepatitis C vírus kiújulása májátültetés után:

A HCV RNS-t minden beteg véréből ki lehet mutatni májátültetést követően, azonban nem minden betegnél alakul ki krónikus hepatitis. Számtalan tanulmány foglalkozik a májátültetést követő HCV kiújulás (szövettanilag is igazolt hepatitis) patomechanizmusával, valamint az erre hajlamosító tényezőkkel.

Immunkompetens betegekben a Th1 $CD4^+$ lymphocytak, illetve $CD8^+$ CTL sejtek szerepe elsődleges fontosságú a HCV fertőzés kontrollálásában (Isd. korábban). Májátültetést követően azokban a betegekben, akikben az immunszupresszió ellenére a $CD4^+$ immunválasz nem gyengült, HCV rekurrencia sem alakult ki, szemben azokkal a betegekkel, akikben az immunszupresszióval párhuzamosan $CD4^+$ válaszgyengülés is mutatkozott, ezekben a betegekben ugyanis a HCV kiújulás súlyos hepatitis formájában jelentkezett (74).

A rekurrencia egyik ritka (az esetek 5-10%-ban alakul csak ki), de igen rossz prognózisú megjelenési formája a cholestaticus típusú HCV rekurrencia (összefoglalva (75)). Ennek jellegzetessége az epeúti és/vagy vaszkuláris szövődmények nélkül kialakult cholestasis, nagyon magas HCV kópiaszám, valamint az 500 U/l feletti ALP és 1000 U/l feletti GGT értékek. A cholestaticus rekurrencia korán jelentkezik, általában már a májátültetést követő első hónapokban (maga a HCV rekurrencia egyébként évekkel a transzplantációt követően is kialakulhat), és pár hónap alatt májelégtelenségbe progrediál. A szövettani elváltozások közül a hepatocyták súlyos ballon degenerációja, intrahepaticus cholestasis, pericellularis és portalis fibrosis, valamint epeúti proliferáció jellemzi (75;76).

Számos olyan faktor ismert, melyek hajlamosítanak a májátültetés után a HCV rekurrencia kialakulására, ezeket az alábbiakban pontokba szedve részlezetem.

- Donor asszociált tényezők:

A **donor életkora** független rizikófaktora a rekurrencia súlyosságának, valamint a csökkent graft-, és betegtúlélésnek (70;71;75). Az egyik tanulmányban 30 évnél fiatalabb donor esetén a HCV kiújulás csak az esetek 14%-ban következett be, azonban amennyiben a donor 59 évnél idősebb volt, úgy a rekurrenciára már az átültetések felében számítani lehetett (77). Egy másik vizsgálatban azt találták, hogy a fibrosis score a víruskiújulást követően 0,6 egység/év-el nőtt, amennyiben a donor 40 évesnél fiatalabb volt, ezzel szemben, amennyiben 50 évnél idősebb donorból távolították el a graftot, a fibrosis progressio mértéke már 2,7 egység/év volt (78). Annak oka, hogy az emelkedett donor életkor miatt rontja a májátültetés utáni eredményeket, csak részben tisztázott. Tény, hogy az idősebb donorokból származó májgraftok esendőbbek a hideg és meleg ischaemiás idővel (CIT és WIT) szemben, rövidebb ischaemiás időket követően is gyakrabban alakul ki a graft reperfüziós (I/R) károsodása. Az ischaemiás/reperfüziós károsodás mechanizmusa a következő: a reperfüzió megindításával a graftot elárasztja a magas oxigén tartalmú vér, melynek hatására hirtelen nagy mennyiségű szabad gyök szabadul fel a beültetett májban. Ez az endothelium gyulladását, következményes érszűkületet (reperfüziós paradox) okoz. Jelentősége az eddigieken túl abban rejlik, hogy részben ennek tulajdonítják egy viszonylag ritka, de rendkívül súlyos és retranszplantációhoz vezető, a májátültetés után hónapokkal, évekkel később kialakuló epeúti szövődmény, az ischaemiás típusú epeúti

károsodás (ITBL) megjelenését is (79). Az idősebb donorok májai gyakran zsírosabbak, illetve sokszor magas a vastartalmuk, melyek önállóan is hajlamosítanak a vírusrekurrenciára és a rapidabban progrediáló májfibroszra (80). Számos centrumban HCV pozitív donorokból is távolítanak el májat, melyet aztán HCV pozitív recipiensbe ültetnek. Ezekben az esetekben nem rosszabbak a májátültetés utáni eredmények annál, mintha HCV negatív donor máját ültetnék be (összefoglalva (81;82)).

-Gazdaszervezet asszociált faktorok:

Amennyiben a transzplantált beteg **nem a kaukázusi rasszba** tartozik, abban az esetben a fibrosis progressziója gyorsabb és a betegtúlélés alacsonyabb (71). A recipiens magasabb **életkora** szintén magasabb HCV asszociált mortalitással társul (83). Érdekes, hogy **nőkben** is rapidabban progrediáló HCV rekurrenciáról számoltak be (összefoglalva (80)). Az **alkoholfogyasztás**, csakúgy, mint immunkompetens betegekben, transzplantáltakban is jelentősen gyorsítja a betegség progresszióját (80). A CD4⁺ sejtek Th2 irányú eltolódása cholestaticus rekurrencia kialakulására hajlamosít (84). Az **inzulin-rezisztencia**, illetve **II.típusú diabetes mellitus** gyakoribb HCV pozitív betegekben (85;86). A májátültetést követően kialakult de novo diabetes mellitus szintén HCV pozitív betegekben fordul elő nagyobb arányban (87;88). Ennek jelentősége az a megfigyelés, miszerint a rekurrencia mellett fennálló cukorbetegség gyorsíthatja a fibrosis progresszióját (37;89), valamint rontja a betegtúlélést (90) (habár olyan közlések is vannak, melyek ezt nem támasztják alá (87;88)). A májátültetés után megjelenő de novo diabetes mellitust a későbbiekben részletesebben is tárgyalom. A recipiens **CMV infekciója** szintén önálló rizikófaktora a HCV rekurrenciának, egyúttal rontja a grafftúlélést (80;91). Ennek okára csak feltételezések vannak, a CMV okozta immunszuppresszió, illetve a nagy mennyiségben felszabaduló TNF α szerepe egyaránt felmerült.

A Transzplantációs Klinikán 2007-ben történt retrospektív vizsgálat során úgy találták, hogy amennyiben a recipiens rosszabb általános állapotban lett transzplantálva (Child Score >11), úgy abban az esetben a vírusrekurrencia hamarabb következett be (70).

-Viralis faktorok:

Kimutatták, hogy a májátültetés előtt mért **magas HCV vérszint** mellett magasabb a májátültetést követően a mortalitás, valamint a rekurrencia súlyosabb hepatitis formájában jelentkezik, emellett a magas posztoperatív HCV kópiaszám hajlamosít a

korán bekövetkező (6 hónapon belül), illetve cholestaticus típusú HCV kiújulásra (70;76;92).

A HCV genotípusa szintén befolyásolja a víruskiújulás súlyosságát. **1b genotípusú HCV**-vel történt infekció esetén súlyosabb hepatitis formájában újul ki a C vírus, emellett a fibrosis progressioja is gyorsabb (93).

-Műtétechnikai hajlamosító faktorok:

Amennyiben a meleg ischaemiás idő nő, a rekurrencia gyakorisága és súlyossága emelkedik. Egy tanulmányban 30 perces meleg ischaemiás idő esetén 19%-nak, míg 90 perces **WIT** idő esetén 65%-nak találták a HCV rekurrencia gyakoriságát (94), habár a retrospektív vizsgálatot kis esetszámon végezték.

-Az immunszuppresszív kezelés:

Az immunszuppresszió szerepe vitathatatlan a vírusrekurrencia kialakulásában, erre indirekt adatok is utalnak. Az egyik az, hogy a rendkívül súlyos és hónapok alatt májelégtelenséget okozó cholestaticus rekurrencia csak immunszuprimált betegekben alakul ki, a másik pedig az a tény, hogy a fibrosis progressziója májátültetést követően sokkal gyorsabb, mint amit immunkompetens betegeknél látunk (71;75). A szteroidok, melyek több ponton is immunszuppresszív hatásúak (gátolják a T-sejtek aktivációját és a T-sejtek által termelt citokinek termelését, emellett a Th sejtek és CTL sejtek működését is gátolják) a mai napig a májátültetést követő bázis immunszuppresszív kezelés részei. Az akut rejeckció kezelésekor alkalmazott nagy dózisú és pulzatis adagolásuk esetén nagymértékben emelik a vérben keringő HCV partikulumok mennyiségét (72). Emellett a szteroid bóluskezelés hatására hamarabb és súlyosabb formában újul ki a HCV hepatitis, gyakrabban alakul ki cholestaticus rekurrencia, gyorsabban progrediál a májbetegség cirrhosisba, valamint csökken a beteg túlélés ((70;72;75), összefoglalva (95)). Mindezekből következik, hogy kulcsfontosságú az akut rejeckció megelőzése HCV pozitív májátültetett betegekben, valamint a szteroidok dózisének mielőbbi csökkentése/szteroid-mentes immunszuppresszió alkalmazása.

A calcineurin inhibitorok a legszélesebb körben alkalmazott immunszuppresszív gyógyszerek májátültetés után. Két képviselőjük a cyclosporin A (CyA) és a cyclosporinnál közel 100-szor nagyobb immunszuppresszív hatással bíró tacrolimus (FK) (96). Mindkét vegyület a cytosolban lévő immunophilinhez kötődik (a CyA a cyclophilinhez, az FK az FK506 kötő fehérjéhez), és az így kialakult komplex gátolja

a calcineurin foszfatáz aktivitását. Ennek hatására a calcineurin nem tudja foszforilálni az NFAT transzkripció faktort, miáltal gátlódik utóbbi transzlokációja a sejtmagba. Ennek következtében pedig egy sor citokin transzkripciója gátlódik és így a T-sejtek aktivációja zavart szenved (97). In vitro a CyA gátolja a HCV replikációját, a tacrolimus ellenben nem (98;99). Ezt azzal magyarázták, hogy az NS5B HCV fehérje működéséhez szükséges a cyclophilin B-vel történő kötés létrejötte, melyet a CyA gátol (99). Ezt az in vitro igazolt antivirális hatást in vivo nem bizonyították. Retrospektív vizsgálatokkal, valamint nagy esetszámú, prospektív, randomizált vizsgálatokkal sem találtak különbséget a HCV rekurrencia idejében és súlyosságában, a fibrosis progresszióban és a beteg túlélésben aszerint, hogy a beteg milyen immunuszuppresszív kezelést kapott (75;95;100), beleértve ebbe a mycophenolat-mofetil és mTOR inhibitorokat is (összefoglalva (95)). Egyedül az OKT3 esetében igazolt, hogy alkalmazása esetén mind a rekurrencia súlyossága (egyúttal a cholestaticus HCV rekurrencia gyakorisága), mind a graftelégtelenség aránya magasabb (összefoglalva (75;101)), emiatt alkalmazása nem javasolt HCV pozitív immunuszuprimáltakban.

3.5.2. A hepatitis C vírus rekurrencia kezelése:

Májátültetést követően a HCV rekurrencia talaján kialakult hepatitis sokkal gyorsabban progrediál cirrhosisba, mint immunkompetens betegeknél. Míg utóbbiaknál a májcirrhosis kialakulása gyakran 20-30 évvel a fertőzést követően alakul ki, addig májátültetést követően 5 évvel a HCV pozitív betegek 20-30%-ban ismételt cirrhosis jelentkezik (93;102). A kialakult cirrhosist követően az esetek 40-50%-ban dekompenzálódik a májműködés egy éven belül (77). A HCV rekurrencia a májátültetés utáni graft vesztés egyik leggyakoribb oka és az elektíven végzett retranszplantációk egyik fő indikációja (összefoglalva (103)).

A HCV rekurrencia kezelésére többféle terápiás sémát is alkalmaznak a transzplantációs centrumok. A cél, ugyanúgy, mint immunkompetens betegeknél is, az SVR elérése. Több közlemény szerint SVR esetén a fibrosis progressioja lassabb (104;105), emellett a beteg túlélés magasabb (106). Számos tanulmány azonban arról számolt be, hogy az SVR nem lassította a fibrosis mértékét (107;108), sőt olyan közlés is van, amely

magasabb fibrosis score-ról számolt be SVR-es betegekben non-responderekhez képest (109).

Az egyik lehetséges kezelési alternatíva a pre-emptív kezelés, tehát az antivirális kezelés megkezdése a közvetlen posztoperatív szakban azért, hogy a HCV rekurrenciát megelőzzék, illetve, ha mégis kiújulna a HCV hepatitis, akkor egy enyhébb formájában következzen csak be. Ezt a fajta kezelési sémát végezték IFN α monoterápiában, IFN α -ribavirin és PEG-IFN α -ribavirin kombinációjával is (110-113). Az SVR-t elérő betegek aránya minden esetben 20% alatt volt, és a számtalan mellékhatás miatt gyakran volt szükség az alkalmazott dózisok csökkentésére.

A másik lehetséges kezelési alternatíva az antivirális kezelés megkezdése kizárólag akkor, amikor szövettanilag is igazolva van a HCV rekurrencia következtében kialakult krónikus hepatitis. Ezt a fajta terápiás sémát szélesebb körben alkalmazzák, mint a pre-emptívét, többek között a budapesti Transzplantációs és Sebészeti Klinikán is ez alapján kezelik a transzplantált betegeket. Csakúgy, mint a pre-emptív kezelés esetében is, ebben az esetben is volt olyan centrum, ahol az IFN α -t monoterápiában alkalmazták, többségében azonban IFN α -ribavirin, vagy PEG-IFN α -ribavirin kombinációt adnak a betegeknek. Az IFN α monoterápiában történő alkalmazása esetén az SVR-t elérő betegek aránya kevesebb volt, mint 12% (110;114). A kombinációban történő alkalmazás esetén az SVR aránya a legtöbb közlés alapján 20-30% közötti (106;115;116).

Számos faktor megegyezik az immunkompetens betegekben is bizonyított, SVR-t előrejelző tényezőkkel. Így pl. az RVR és EVR, az 1-estől eltérő HCV genotípus (117-119), illetve az IL-28 gén polimorfizmusa (120). Annak ellenére, hogy a rapid és korai vírusválasz nagyon erős előrejelzője a tartós vírusmentességnek (119), az immunkompetens betegeknél használt STOP-szabályt a májátültetés után sok esetben nem alkalmazzák (így a SE Transzplantációs és Sebészeti Klinikán sem), inkább egy jól tolerálható dózisban alkalmazott, fenntartó kezelés mellett próbálnak minél alacsonyabb HCV kópia számot tartani a betegeknél. A donor életkora nemcsak a HCV rekurrencia súlyosságát, de az antivirális kezelés sikerét is hátrányosan befolyásolja. Az immunszuppresszió szerepe vitatott az SVR kialakulásában, a legtöbb közleményben nem volt különbség az SVR-t elérő betegek arányában aszerint, hogy milyen immunszuppresszív kezelést kaptak ((110;121), összefoglalva (122)), azonban

beszámoltak már a cyA használata mellett nagyobb eséllyel bekövetkező tartós vírusmentességről is (117;123). Fiatalabb recipiensek inkább reagálnak jól az antivirális kezelésre (124). A transzplantáció előtti HCV kópiaszám szerepe az SVR előrejelzésében vitatott, vannak közlések, melyek alacsonyabb indulási HCV titer esetén nagyobb arányú tartós vírusmentességről számoltak be (124), azonban ezzel ellentétes eredmények is napvilágot láttak (39;116). Az inzulin-rezisztencia szintén rontja a beteg esélyeit a tartós vírusmentesség elérésére (Izd. később) (39).

3.5.3. A májátültetés után megjelenő (de novo) diabetes mellitus:

A krónikus májbetegségek gyakran társulnak II. típusú cukorbetegséggel (125). Ezt a jelenséget a krónikus HCV infekció esetében is megfigyelték (126;127), ennek patomechanizmusát az alábbiakban részletesen ismertetem.

Az inzulin számos hatását az inzulin receptor szubsztrát (IRS) 1 és 2 közvetítésével fejti ki (összefoglalva (128)). Az IRS-t az inzulin receptor foszforilálja, így aktiválja. Az inzulin receptoron kívül foszforilálhatják még az inzulin-szerű növekedési faktor 1 receptor tirozin kinázok is (129). Az IRS szignál-kaszádron keresztül fejti ki hatását, SH2 doménnel rendelkező fehérjék, pl. foszfatidil-inozitol 3-kinázok (PI-3 kináz) közreműködésével (130). A PI-3 kinázok, valamint egyik szubsztrátjuk, az Akt kulcsfontosságú az inzulin hatásmechanizmusában (131). Az IRS1 defektusa nem okoz diabetest, csak inzulin rezisztenciát (IR), és kompenzatorikus hyperinsulinaemia kíséri (132). Az IRS2 hibás működése azonban cukorbetegséget okoz, ugyanis az inzulin rezisztencia ebben az esetben csökkent inzulin szekrécióval társul (133). Az inzulin rezisztenciát a homeostasis model assesment (HOMA) számításával mérik, mely definíciói az alábbiak: beta-sejt funkció (HOMA- β)= éhomi inzulin ($\mu\text{U/ml}$) x 360/ éhomi cukor (mg/dl)-63; inzulin rezisztencia (HOMA-IR)= éhomi glükóz (mg/dl) x éhomi inzulin ($\mu\text{U/ml}$)/405, vagy pedig IR=éhomi inzulin (mU/l) x éhomi cukor (mmol/l)/ 22,5 (134).

Egy tanulmányban, nem cirrhotikus betegekben, krónikus HCV infekció esetén emelkedett éhomi inzulin szekréciót és magasabb HOMA- β és HOMA-IR értékeket mértek, mint egyéb krónikus májbetegségekben (135). A hyperinsulinismust azzal magyarázták, hogy progresszív májfunkció romlás esetén károsodik a first pass effektus,

és mivel fiziológiásan az inzulin vérben található mennyiségének közel felét a máj ezzel a mechanizmussal lebontja, károsodott májfunkció esetén ez a degradáció csökken (136). Szintén ebben a tanulmányban közölték azt is, hogy minél előrehaladottabb volt a máj fibrotikus átépülése, annál magasabb éhomi inzulin szekréción és HOMA-IR-t lehetett kimutatni (135), valamint annál alacsonyabb IRS1 és IRS2 fehérje szinteket mértek (135). Ezekkel az eredményekkel korrelálnak egy másik munkacsoport következtetései is, akik szintén magasabb inzulin szekréción mutattak ki HCV pozitív betegekben, feltehetőleg az inzulin rezisztencia kompenzálására (127). Egy további munkacsoport ellenben úgy találta, hogy krónikus HCV hepatitisben szenvedő, de nem cirrhotikus betegek inzulin szekréciónja csökkent, viszont ebben a tanulmányban is kifejezettebb inzulin rezisztenciát figyeltek meg a C vírussal fertőzött betegekben HCV negatív betegekhez képest (137). Aytug és munkatársai magasabbnak találták mind az inzulin receptor, mind az IRS-1 expressziót HCV fertőzött betegekben, azonban úgy találták, hogy ebben a beteganyagban az IRS-1/PI-3 kináz kapcsolat és így az Akt aktivációja gátolt volt (138), ez pedig fokozott glukoneogenezist eredményez. Igazolták azt is, hogy a HCV a TNF α termelésének fokozásával az IRS-1/2 szerin régiójának foszforilációját okozza és a SOC3 gátló citokinek termelését is elősegíti, utóbbiak pedig gátolják az Akt és a PI3K foszforilációját (139).

Az inzulin rezisztencia súlyossága és a vírus genotypusa között egyes tanulmányok találtak összefüggést, ezekben 1-es és 4-es genotypusú HCV okozta fertőzés esetén gyakrabban figyeltek meg IR-t, mint egyéb genotypusú infekció esetén (140). Az inzulin rezisztencia súlyosbítja a HCV okozta májfibrosis súlyosságát (37;38), emellett gyakran társul steatosissal, mely szintén a fibrosis progresszióját segíti elő (141). Az IR továbbá hátrányosan befolyásolja az antivirális kezelésre adott választ (39). 1-es genotypusú HCV-vel fertőzött betegeket vizsgálva kifejezettebb inzulin rezisztencia (HOMA-IR>2) esetén 32%-nak találták a tartós vírusválaszt elérő betegek arányát, míg alacsony inzulin rezisztencia mellett (HOMA-IR<2) ez az arány 60% volt (39).

A HCV infekció és az inzulin rezisztencia, illetve a diabetes mellitus kapcsolata májátültetés után is bizonyított (88;126). A de novo diabetes mellitus (NODAT) kórlefolyása, patomechanizmusa megegyezik a II. típusú cukorbetegségével (Izd. összefoglalva (142). A NODAT prevalenciáját májátültetés után 5-27% közöttinek találták, a nagy szórás oka a betegség eltérő definícióiból adódott (87;143), erre még

kitérek később a megbeszélés fejezetben. A de novo diabetes jelentőségét az adja, hogy jelentősen emeli a kardiovaszkuláris morbiditást és mortalitást, a rejekció arányát, a graft vesztést és az infekciók gyakoriságát ((88;144), összefoglalva (90)).

A transzplantáció utáni de novo diabetes mellitus hajlamosító faktorai részben megegyeznek az immunkompetens betegek cukorbetegsége hajlamosító rizikófaktoraival (pl. életkor, obesitas, metabolikus szindróma), azonban fő oka az immunszuppresszív gyógyszerek alkalmazása (90), azok közül is elsősorban a calcineurin inhibitorok és kortikoszteroidok használata. A szteroidok az inzulin rezisztencia fokozásán keresztül vezetnek diabeteshez, míg a calcineurin inhibitorok az inzulin szintézis és szekréció gátlás miatt diabetogének. A calcineurin inhibitorok közül a tacrolimus használata esetén gyakrabban figyelték meg a NODAT megjelenését, mint a cyclosporinnál ((88), lsd. összefoglalva (145)).

Több vizsgálat során is azt találták, hogy amennyiben a HCV kópiaszám magasabb a vérben a májátültetést követően, abban az esetben az inzulin rezisztencia mértéke is kifejezettebb (37;126). Ugyanakkor az egyik nagy esetszámú, immunkompetens betegekkel történő tanulmányban nem találtak összefüggést a HCV kópiaszám és az inzulin rezisztencia (HOMA-IR) súlyossága között (146).

A de novo diabetes mellitusnak a HCV rekurrencia kialakulására és progressziójára gyakorolt hatását vizsgáltuk a hazai beteganyagban, eredményeinket a megfelelő fejezetben ismertetem.

3.5.4. A kiterjesztett donor szelekciós kritériumok a hepatitis C vírus vonatkozásában:

Fontos probléma, hogy a májvárólistán lévő betegek számának növekedésével nem nő párhuzamosan a donorok száma (sőt, stagnál a cadaver donációkból származó májgraftok mennyisége), ezért jelentős diszkrétancia van a szükséges és elérhető szervek mennyiségében (147). Többféle módon is próbálják a transzplantációs centrumok növelni a májátültetések számát, pl. split liver technikával, élő-donoros transzplantációval (összefoglalva (148;149)), illetve a donor szelekciós kritériumok liberálisabb kezelésével. ECD donornak (extended criteria donor, régen marginális donornak is hívták őket) nevezzük azokat a donorokat, melyekből eltávolított szervek

átültetése magában rejti a kockázatát a transzplantációt követően kialakuló primary non function-nek (PNF) és initial poor function-nek (IPF) (összefoglalva (150)). Nincsen egységes álláspont azokban a kritériumokban, melyek alapján marginálisnak tartanak egy donort, és abban sem, hogy hány feltétel teljesülése esetén tekintenek egy donort ECD-nek, ezeket a megbeszélés fejezetben részletezem.

A MELD (Model for End-Stage Liver Disease) score a májbetegség súlyosságát jelző mutató, mely az INR-ből, szérumbilirubinból és szérum kreatininből számított érték (151). Minél magasabb ez a pontszám, annál magasabb a beteg transzplantáció nélkül várható mortalitása, emiatt a transzplantációs várólistákon a magasabb MELD score-al rendelkező betegek előnyt élveznek az alacsonyabb pontszámú recipiensekkel szemben („sickest first”).

Fontos kérdés, hogy a donor-recipiens párosítás befolyásolja-e a májátültetés utáni eredményeket, ezen belül is a HCV rekurrencia gyakoriságát, ez kutatásom egyik területe volt, melyeket az eredmények és megbeszélés fejezetben részletesen ismertetek.

3.5.5. Retranszplantációk a hepatitis C vírus vonatkozásában:

Amennyiben a HCV rekurrencia talaján ismételten végstádiumú májelégtelenség alakult ki, szükségessé válik a retranszplantáció (RT). Általánosságban elfogadott tény, hogy retranszplantációt követően rosszabbak az eredmények, mint a primer OLT-t követően (152), és nem csak HCV pozitív betegekben, a mortalitás legfőbb oka ugyanis nem a HCV rekurrencia, hanem posztoperatív komplikációk, pl. infekciók. A HCV infekció számos tanulmány szerint önmagában nem emeli a mortalitást retranszplantáció követően (152;153), azonban ezzel ellentétes eredmények is napvilágot láttak ((154), összefoglalva (103)). A legfőbb halálok RT-t követően a sepsis és a primary non-function (PNF). A legfőbb mortalitást növelő faktorok RT-t követően a magas donor és recipiens életkor, női donorból származó máj átültetése, a recipiens beszűkült vesefunkciója, illetve magas szérumbilirubin szintje, a retranszplantációra váró beteg 25 feletti MELD score-ja, illetve felmerült a cyclosporine eredményeket rontó szerepe is (összefoglalva (103)). Fentiekből következik, hogy az elektív retranszplantáció megfelelő időzítése, valamint az egyénre szabott donor-recipiens párosítás elengedhetetlen a retranszplantáció sikerességéhez.

A hepatitis C vírus klinikai jelentőségének ismertetése után az alábbiakban részletezem a HCV sejtbelépéséről szerzett eddigi ismereteinket, ez ugyanis kutatásom fő területe volt.

3.6. A hepatitis C vírus sejtbelépésének (entry) vizsgálatához használatos modellek:

Egy fertőző ágens (jelen esetben vírus) vizsgálatához elengedhetetlen egy hatékony in vitro (sejttenyészet) és in vivo modell (állatkísérletek), melyek révén a kórokozó sejtbelépésének elemi jelenségei, a sejtekben kiváltott adaptív és/vagy cytopathias hatások vizsgálhatóak, emellett terápiás módszerek dolgozhatóak ki. Ebben a fejezetben a HCV kutatásához használt/használatos modelleket részletezem, ezek ismerete ugyanis elengedhetetlen a HCV entry irodalmában történő eligazodáshoz.

-Vérből izolált HCV (serum-derived HCV-sHCV):

A HCV csak az embert és a csimpánzt betegíti meg, ezért a vírus izolálását követő első években a megbetegedett emberek és csimpánzok szérumból kinyert HCV partikulumokat (sHCV) használták a kísérletekhez. Ismeretlen okból azonban az sHCV gyakorlatilag alig replikálódik primer humán hepatocytakban és hepatoma sejtvonalakban (összefoglalva (155)), melyek a leggyakrabban használt ún. HCV permisszív sejtek (olyan sejtek, melyekbe in vitro be tud jutni a HCV, mert tartalmazzák az ehhez szükséges vírusreceptorokat a plazmamembránjukban). További problémát jelent, hogy nehéz a sejtekbe bevitt és frissen replikálódott HCV partikulumok közötti különbségtétel. A HCV a vérben különböző formában van jelen (többnyire lipoproteinekhez kötődik, lsd. később) és így nem lehet egy homogén sHCV populációt izolálni (összefoglalva (18)), ez szintén hátrány a kísérletek reprodukálhatósága szempontjából. Végül korlátozza az sHCV alkalmazhatóságát az is, hogy korlátozottan lehet hozzájutni primer humán hepatocytakhoz és HCV pozitív beteg vérmintájához.

-Rekombináns E2 glikoprotein használata:

A szérumból izolált HCV partikulumok korlátozott használhatósága miatt a HCV sejtbelépésének egyik következő módszere az E2 envelope glikoprotein egy módosított

formájának a használata volt. A módosításra azért volt szükség, mert a HCV envelope fehérjei részben dimerizálódnak, részben a megfelelő konformáció elnyeréséig hosszasan elidőznek az ER-ben (lásd korábban). Emiatt szinte lehetetlenné vált olyan sejtek létrehozása, melyek a plazmamembránjukba beépítik ezt a fehérjét (ami pedig elengedhetetlen lenne a HCV sejtbejutásának vizsgálatához) (összefoglalva (156;157)). A módosítást az E2 fehérje TMD domain-jének kiiktatásával sikerült kiküszöbölni, így alkották meg az E2 glikoprotein solubilis formáját (sE2) (158), mely jól alkalmazható volt a HCV entry elemi jelenségeinek vizsgálatához. A hepatitis C vírus sejtbelépéséhez szükséges receptorok közül a CD81-et (159), az SRB1-et (160), illetve az alacsony affinitású, pusztán a HCV hepatocytákhoz horgonyzásában szerepet játszó heparán-szulfátot (161) ezzel a módszerrel azonosították először, azonban csak a receptor-sE2 kötés létrejöttét tudták így igazolni, a célmolekulák HCV entryben betöltött szerepét nem. Szintén hátránya volt ennek a metodikának, hogy míg in vivo a HCV envelope fehérjék heterodimert alkotnak (lsd. korábban), ezekben a kísérletekben pusztán az E2 glikoprotein solubilis formájának kötődését vizsgálták a feltételezett vírus receptorokhoz, így csak következtetni lehetett arra, hogy az E1-E2 komplexet tartalmazó szérumban keringő HCV partikulomok csakugyan ezeken a receptorokon keresztül kötődnek a gazdasejthez.

-HCV-szerű partikulumok (HCV-like particles-HCV-Lp):

Egy időben in vitro szintetizált HCV-szerű partikulumok (HCV-Lp) használatával próbálták modellezni a HCV sejtbelépését és intracellularis életciklusát. A vírus-szerű partikulum (V-Lp) nem tartalmaz genomot, következésképp nem tud replikálódni sem (összefoglalva (156)). A HCV-Lp-t olyan rovar sejt vonalakban szintetizálták, amikbe a HCV strukturális fehérjeit tartalmazó baculovírus vektort jutattak be. Habár a HCV-Lp E1-E2 komplexet tartalmaz, annak glikoziláltsága eltér az sHCV-ből izolálható envelope fehérjétől, ugyanis nem humán, hanem rovar sejtekben szintetizálták. További hátránya ennek a rendszernek, hogy a HCV-Lp nem szekretálódik, inkább felhalmozódik az intracellularis vesiculumokban, így nagyon nehézé válik a preparálásuk (összefoglalva (18)).

-HCV pseudopartikulumok (HCVpp):

Igen nagy mérföldkő volt a HCV entry vizsgálatában a hepatitis C vírushoz nagyon hasonló HCVpp megszentizálása, mely Birke Bartosch és munkacsoportja nevéhez

fűződik (162;163). A HCVpp egy olyan retro-, vagy lentivirus partikulum, mely tartalmazza a HCV módosítatlan E1-E2 glikoproteinjeit, a vektorként használt retro-, vagy lentivirus core proteinjét és egy marker gént tartalmazó provírus genomot. A marker gén egy zölden fluoreszkáló festék fehérjét (GFP), vagy luciferázt (enzim család, mely tagjai az élővilágban fellelhető egyik pigmentet, a luciferint oxidálják és ezáltal a pigment látható fényt bocsát ki, összefoglalva (164)) kódol. Retrovírus esetén a core protein rácsáló leukémia vírusból (murine leucaemia virus-MLV) származik. Az E1 és E2 envelope fehérjék az 1a és 1b HCV genotípusokból lettek izolálva ebben a modellben. Az előbb részletezett összetevőket tartalmazó 3 vektort 293T humán embrionális sejtekbe juttatják és a HCVpp-t ezek a sejtek szintetizálják. A CD81 és SRB1 szerepét a HCV sejtbelépésében részben ezzel a modellel tisztázták, emellett a többi ismert/feltételezett HCV receptort is többek között HCVpp használatával vizsgálták (összefoglalva (18;156)). A fő hátránya ennek a modellnek, hogy a HCV entry korai lépéseit lehet csak vizsgálni vele, emellett a HCVpp nem asszociálódik lipoproteinekkal, tekintettel arra, hogy 293T sejtekben termelődnek, melyek nem szintetizálnak lipoproteineket (18).

-Sejtkultúrában termelt HCV (cell culture produced HCV-HCVcc):

A következő mérföldkő a HCV kutatásában egy fulmináns hepatitisben szenvedő japán beteg véréből izolált 2a genotípusú, JFH-1-nek elnevezett HCV partikulum izolálása és klónozása volt, ugyanis ezzel a vírussal hatékonyan tudtak human hepatoma-7 (Huh7) sejteket fertőzni, és az így képződött vírus partikulumok mind in vitro, mind in vivo fertőzőképesnek bizonyultak (165). Ezzel a modellel a vírus teljes életciklusa vizsgálható, azonban ennek a módszernek is vannak limitáló tényezői. Az egyik legfontosabb ezek közül, hogy csak a már említett JFH-1 izolátum replikálódik in vitro, tehát a többi HCV genotípus így nem vizsgálható. További hátrány, hogy a JFH-1 csak a Huh7 sejtekben és ezek szubklónjaiban replikálódik, mely sejtek lipoprotein metabolizmusa abnormális, így nem tud kellően magas lipid tartalmú lipo-viro-partikulum (ld. később) képződni bennük, mely az állatkísérletek során nagy hátrány, ugyanis minél magasabb a HCV partikulumok lipid tartalma, annál magasabb az infektivitása is in vivo (166).

3.7. A hepatitis C vírus belépése a hepatocytakba:

A HCV a véráramba bekerülve igen heterogén formában juthat el fő célsejtjéhez, a hepatocytához. Többségében β -lipoproteinekhez kötődik (167;168) (azon belül is főleg a VLDL-hez, de asszociálódhat HDL-el és LDL-el is), ezek egyik előfordulási formája az ún. alacsony denzitású lipo-viro-particulum (LVP) (169). Kisebb részben fordul elő „szabad” formájában, vagy mint exosoma (membránnal körülvett vesiculum, mely a membránban HCV envelope fehérjéket, CD81-et, illetve az intravesicalis térben HCV RNS-t tartalmaz) (170), illetve, mint envelope borítás nélküli nucleocapsid (171). A lipo-viro-partikulumok triglicerid gazdag lipoproteinek, melyek tartalmazzak apolipoprotein (Apo)B-t és ApoE-t, vírus nucleocapsidot és envelope glikoproteineket. Lipo-viro-partikulumok a hepatocytakon kívül enterocytakból is felszabadulnak, mely a HCV egyik rezervoár forrása (172), erre az LVP apolipoprotein tartalma utal. Amennyiben ApoB100-at tartalmaz, úgy a vírus hepatocytában replikálódott és asszociálódott a lipid frakciókkal, míg az ApoB48 jelenléte az LVP enterocyta eredetére utal (173). A HCV bejutásának mechanizmusa az enterocytakba kérdéses, ugyanis az egyik legfőbb HCV entry receptor, a CD81 nem található meg a bélhámsejtek plazmamembránjában (174). A HCV-t sikerült még izolálni az enterocytakon kívül fehérvérsejtekből (peripheral blood mononuclear cells-PBMC, B-sejtek), antigén prezentáló dendriticus sejtekből, agyból (175-177), valamint kevert cryoglobulinaemiában szenvedő C vírussal fertőzött betegek bőrének hámsejtjeiből is (178). Annak ellenére, hogy PBMC sejtekből sikerült sHCV-t izolálni, a HCVpp bejutását nem sikerült igazolni ezekbe a sejtekbe (163), ezenfelül a vírus replikációja sem bizonyított sem PBMC, sem a többi, a HCV perzisztációjában szerepet játszó sejtben. A szérumban keringő HCV (sHCV) lipoprotein tartalma összefügg a vírus infekció készségével, ugyanis az alacsony sűrűségű, magas lipid tartalmú sHCV-t nagymértékben fertőzőképesnek találták csimpánzokban (166;179). Emellett a sejt kultúrában termelt HCVcc-vel fertőzött csimpánzokból, illetve uPA-SCID egerekből visszaizolált HCV nagyobb mértékben volt fertőzőképes sejt kultúrában, mint az eredeti HCVcc, és ennek az állatokból izolált HCV partikulumok magas lipoprotein tartalma volt az oka (180).

A vérben keringő HCV a májsejtek sinusoidalis (basolateralis) felszínével kerül először kapcsolatba. A HCV partikulumok a máj sinusoidok endothel sejtjein, illetve az ezek szomszédságában található Kupffer sejtek felszínén expresszálandó dentritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) és liver-specific (L-SIGN) fehérjék, mint „horgonyzó” receptorok kötésével kerülnek a hepatocyták felszínéhez (181). Mind a két fehérje a HCV E2 glikoproteinjével kerül kapcsolatba (54;182). Mind a DC-, mind az L-SIGN a C-lektinek családjába tartozik. Fiziológias funkciójuk a dentritikus sejtek és T-lymphocyták (DC-SIGN), illetve a máj sinusoidok endothel sejtjei és leukocyták közötti kötés kialakítása (L-SIGN), azonban számos kórokozó (így a HCV is) kötésében, internalizációjában és eliminációjában is szerepet játszanak (összefoglaló cikkek (183;184)). Mind a szérumból izolált HCV (sHCV), mind a solubilis envelope fehérje (sE2) és mind a HCVpp kötődik az L-SIGN és DC-SIGN fehérjékhez (54;185;186). A lektinek közül felmerült még a hepatocyták plazmamembránjában expresszálandó asialoglycoprotein receptor (**ASGPr**) szerepe a HCV entryben. HCV permisszív human hepatocyták nem tudták felvenni a HCV-Lp-t az ASGPr ligandjainak adását követően. Ez magyarázható azzal, hogy a feleslegben alkalmazott szubsztrát gátolta az azonos kötési helyen létrejövő ASGPr-HCV-Lp kapcsolat létrejöttét. Emellett a HCV-Lp internalizálódott egér 3T3-L1 sejtekbe, amennyiben azokban ASGPr-t expresszáltattak (187). Mindezek ellenére az asialoglycoprotein receptor szerepe a HCV entryben kérdéses, ugyanis HCVpp és HCVcc modellek használatával a vírus internalizációjában betöltött szerepét nem sikerült bizonyítani.

Miután a C vírus a hepatocyták sinusoidalis plazmamembránjának közelébe jutott a lektinokkal való kapcsolódás következtében, a májsejtek felszínén található **heparán-szulfát**-hoz (**HS**) kötődik (161). A HS a glükózaminoglikánok (GAGs) családjába tartozó lineáris poliszacharid. Csakúgy, mint a lektinek, a GAGs is számos vírus sejtbe jutásának elengedhetetlen fontosságú receptorai. Alacsony affinitású receptorok, szerepük abban van, hogy a vírusok elegendő közelségbe kerüljenek az entry későbbi lépéseiben résztvevő magas affinitású, erős kötést biztosító, specifikus receptorokhoz. In vitro heparin (HS analóg) és heparináz (HS-t bontó enzim) adásával sikerült az sE2 és HS kötést gátolni (188;189). Habár az sE2-HS kötés bizonyított, az E1-E2 heterodimert tartalmazó HCVpp-vel történt kísérletek nem tudták megerősíteni ezeket

az eredményeket (190). Az emberi vérben keringő HCV talán nem is az E1-E2 glikoproteinjein keresztül kapcsolódik a heparán-szulfáthoz, hanem a HCV-hez asszociált lipoprotein segítségével, a **lipoprotein-lipázzal (LPL)** történt előzetes kötődés után (191). A HCVcc bejutását HCV permisszív sejtekbe ugyanis gátolni tudták exogen LPL adásával, továbbá a HCV sejtbe lépése csak HS jelenlétében ment végbe (191).

A szérumban keringő HCV sejtbe jutásához (szintén még az entry korai fázisában) szükséges még az alacsony sűrűségű lipoprotein receptor (**low-density lipoprotein receptor-LDL-R**) is. Az LDL-R a szérumban keringő koleszterin, elsősorban az LDL felvételét katalizálja a májsejtekbe. Az LDL-t, receptorához történt kötődését követően clathrin-mediált endocytosisal felveszik a májsejtek, majd az endosomába kerül, ahol az LDL-R-LDL kötés felbomlik. Ezt követően a lipoproteinek a lizoszómákban degradálódnak és a koleszterin itt szabadul fel a sejtekben (Izd. összefoglaló cikkeket (18;192)). Azt, hogy az LDL-R hepatitis C vírus receptor lehet, már a vírus felfedezését követő első években felvetették. Kevert cryoglobulinaemiában szenvedő, HCV pozitív betegek vasculitises laesioiból származó bőr hámsejtekben (amikből izolálni is tudták az sHCV-t, lsd. előbb) ugyanis az LDL-R up-regulálva volt (178). Ezért LDL-R-t tartalmazó fibroblastokat kezelték LDL-R specifikus antitestekkel, melyet követően ezekbe a sejtekbe a sHCV sokkal kisebb mértékben tudott bejutni (167). Az LDL-R C vírus receptorként betöltött szerepét később hepatoma sejtvonalak használatával is bizonyították (193). HCV fertőzött betegek véréből izolált PBMC sejtek felszínén annál magasabb volt az LDL-R expresszió, minél magasabb volt a plazma LDL koncentrációja és a szérumban keringő HCV titere (194). Ugyanakkor krónikus HCV hepatitises betegek májbiopsziás mintáiban a hepatocytak plazmamembránjában lévő LDL-R mRNS expresszió negatívan korrelált a szérum LDL koncentrációval és HCV core antigen mennyiségével, habár fehérje szinten nem vizsgálták ebben a tanulmányban az LDL-R expressziót (195). A vérben keringő HCV hepatocytakba történő belépését befolyásolják a vírus partikulumhoz asszociált lipoprotein apolipoproteinjei, melyek a LPL és LDL-R működésére mind gátló, mind stimuláló hatást kiválthatnak. Az ApoC2 pl. fontos aktivátora a LPL-nak, míg az ApoC3 gátolja a lipoproteinek interakcióját a HS-LPL komplex-el (Izd. az alábbi összefoglalót (196)). A vérben keringő HCV többségében ApoE-t és ApoB-t tartalmazó VLDL-hez és/vagy

LDL-hez kapcsolódik azonban kisebb arányban ApoC1-t is tartalmazhat a LVP (169;171;193). Az ApoC1 exogen adásával nőtt a HCVpp infektivitása (197), az ApoB és ApoE expressziójának gátlásával pedig mind a HCV partikulumok képződése, mind infektivitása csökkent (198).

A HCV, miután az alacsony affinitású receptorok a májsejtek sinusoidalis felszínéhez horgonyozták, hozzákötődik a tetraspanin **CD81**-hez. A tetraspanin fehérje család tagjai számtalan funkciót látnak el, többek között szabályozó szerepet töltenek be a sejtek migrációjában, adhaesiojában, fúziójában, proliferációjában stb. A CD81 egy 25 kDa nagyságú tetraspanin fehérje, mely négy transzmembrán domént, két kicsi és egy nagy extracellularis hurkot (small and large extracellular loops- SEL és LEL), illetve egy N- és egy C-terminális intracellularis domént tartalmaz. A CD81 része a B/T lymphocytáknak és szerepe van a vesiculumok fúziójában (összefoglalva (199;200)). Elsőként Pileri és munkacsoportja vetette fel, hogy a CD81 HCV receptorként is funkcionálhat, ugyanis kísérleteikben a CD81 LEL régiójához hozzákötődött az sE2 (159). Ezt a felvetést később bizonyították a HCVpp-vel történt kísérletek, ugyanis a CD81 ellenes antitestek megakadályozták a HCVpp bejutását primer human hepatocytákba és hepatoma sejtvonalakba (162;201). Emellett HepG2 és HH29 sejtek, melyek nem hordoznak a felszínükön CD81-et, ektópiás CD81 expresszió esetén fertőzhetőek voltak HCVpp-vel (162;202). Ezeket a kísérleteket később HCVcc-vel is igazolták (165;203). A CD81 LEL-sE2 kötés fajspecifikus, ugyanis az sE2 fehérje nem kötődött egér és patkány CD81-hez (204). Ezenfelül a HCVpp és HCVcc sokkal nagyobb mértékben jutott be azokba a HepG2 sejtekbe, melyek felszínén emberi és csimpánz CD81-et expresszáltattak, szemben az egérből, vagy hörcsögökből származó CD81-et hordozó HepG2 sejtekkel (204). Ráadásul hörcsög ovariumból származó CHO sejtek fogékonysága a HCVpp és HCVcc iránt szintén sokszorosára nőtt, ha a még eddig nem részletezett HCV receptorok közül a CD81 emberi eredetű volt (205). Mindezekből következik, hogy a HCV már korábban ismertetett fajspecifitásáért részben az tehető felelőssé, hogy a HCV csak az emberi és csimpánz CD81 LEL régiójához képes kötődni. A sejtfelszíni CD81 expresszió mértéke egyértelműen befolyásolja a sejt fogékonyságát a HCV infekció iránt: egy plató eléréséig a fogékonyság mértéke nő, majd onnan nem változik tovább (206). Ugyanakkor arra is vannak adatok, hogy a perzisztáló HCV infekció esetén a sejtfelszíni CD81 expresszió

csökkenhet a további szuperinfekció kivédésére (207). Ezzel részben ellentétesek Schaller és munkacsoportja eredményei, akik krónikus HCV infekció esetén in vitro nem találtak változást a CD81 sejt felszíni expressziójában, ugyanakkor ők is úgy találták, hogy a sejtek egy idő után nem voltak fogékonyak a további HCV fertőzésre (208). Azt feltételezték, hogy ennek az okát a vírus sejtbelépése után kell keresni, méghozzá a HCV RNS transzlációjának és replikációjának csökkenésében.

A CD81 sejt felszíni expresszióját emberi májban kevesen vizsgálták. A májsejtek polarizált sejtek, megkülönböztetünk egy apicalis (canalicularis), illetve egy basolateralis (sinusoidalis) felszínt (209). Májresectio során eltávolított rezekátumok, illetve transzplantált májak vizsgálatával úgy találták, hogy a CD81 a legnagyobb mértékben a sinusoidalis endothel sejteken, illetve a májsejtek basolateralis felszínén expresszálódik (210;211). Ez logikus, hiszen in vitro kísérletek alapján a CD81 egy ún. post-binding („kötődés utáni”) receptor, tehát közvetlenül azután kötődik hozzá a HCV, miután az alacsony affinitású receptorok odahorgonyozták a májsejtek felszínére (201), és a hepatocyták a vérrel a sinusoidalis felszínükön keresztül érintkeznek. A CD81 nemcsak pusztán megköti a HCV-t, hanem a Rho GTP-ázok aktivációjával részt vesz az aktin filamentumok átrendeződésében és így a HCV-receptor komplex transzlokációjában a májsejt sinusoidalis felszínéről az apicalishoz (212), ahol további HCV receptorok helyezkednek el. Ezenfelül a hepatitis C vírus CD81-hez kötődését követően aktiválódik a Raf/MEK/ERK jelátviteli út a hepatocytákban (212), mely szignál-transzdukciós út szerepét felvetették a perzisztens fertőzés okozta gyulladás és fibrosis súlyosságának befolyásolásában, valamint az immunválasz kivédésében egyaránt (213). A CD81-nek az adaptív immunválasz befolyásolása révén nemcsak a HCV okozta hepatitis súlyosságában, de az extrahepatikus tünetek kialakulásában is szerepe lehet (201;214).

A CD81 mellett egy másik, szintén az entry korai fázisában szerepet játszó receptor a scavenger receptor B 1 (**SR-B1/Cla1**). Az emberi SR-B1 egy 509 aminosav hosszúságú, 82 kDa tömegű glikoprotein, mely számos sejtben expresszálódik, azonban leggyakoribb előfordulási helye a máj és különböző szteroid érzékeny szövetek (összefoglalva (215)). Két citoplazmatikus domént, két transzmembrán domént és egy nagy extracelluláris hurkot tartalmaz. Fő funkciója a koleszterin felvétele a HDL-ből, azonban egyéb lipoproteineket is képes megkötni (LDL, VLDL). 2002-ben Scarselli és

munkacsoportja közölte először, hogy az SR-B1-hez hozzákötődik az sE2 (160). Az E2 fehérje HVR-1 régiója felelős a kötés létrejöttéért, ennek a régióknak a kiütése megakadályozza az sE2-SR-B1 kötés létrejöttét (160), és jelentősen csökkentette a HCVpp infektivitását is (216). SR-B1 ellen termelt antitestek meggátolták a HCVpp és HCVcc HCV permisszív sejtekbe jutását (216;217). Úgy találták, hogy az sE2-SR-B1 kötés szintén fajspecifikus, csakúgy, mint a CD81 esetén (160), azonban később bebizonyosodott, hogy a HCVpp és HCVcc sejtbejutásához az emberitől eltérő fajból származó SR-B1 jelenléte is elegendő a plazmamembránban (205). Az SR-B1, csakúgy, mint a CD81, ún. post-binding receptor, azaz a HCV azután kerül kapcsolatba vele, miután a májsejt felszínéhez horgonyzódott (217). Azt, hogy az SR-B1-nek az entry korai fázisában van szerepe, jelzi az is, hogy a CD81-el megegyezően a májsejtek sinusoidális felszínén expresszálódik a legnagyobb mértékben *in vivo* (211). A HDL, mint az SR-B1 legfőbb szubsztátja, növeli a HCVpp és HCVcc infektivitását, annak ellenére, hogy nincs direkt kölcsönhatás a HDL és a vírus között (218;219). A HDL feltehetőleg az SR-B1-et aktiválja, vagy a HCV lipid burkával kerül kapcsolatba és így növeli az infektivitást. Ugyanakkor a VLDL, illetve oxidált LDL (mint szintén természetes SR-B1 ligandok) exogén adásával az sHCV és HCVpp infektivitása csökkent (220;221). Mind a CD81, mind az SR-B1 a plazmamembrán koleszterin gazdag régiójában helyezkedik el, és ezen régiók koleszterin tartalmának csökkentése szignifikánsan csökkentette a CD81 expressziót, ezáltal a HCV iránti fogékonyságot is (222). Tekintettel arra, hogy nincs bizonyíték az E1-E2 heterodimer és SR-B1 közötti kötés kialakulására (annak ellenére, hogy az sE2 kötődik az SR-B1-hez), az SR-B1 szerepe a HCV entryben részben a CD81 expresszióhoz elengedhetetlen plazmamembrán koleszterin tartalom fenntartása lehet (223). Egyre több adat szól amellett, hogy *in vivo* az SR-B1 nem is a HCV envelope fehérjével, hanem a lipid burkával kerül kapcsolatba, ugyanis míg E2 és HVR-1 ellen termelt antitestek nem csökkentették a HCV SR-B1 mediált sejtbejutását, addig a lipid burok egyik alkotóeleme, az ApoB ellen termeltek igen (220).

A hepatitis C vírus, miután hozzákötődött a CD81-hez és az SR-B1-hez, a májsejt basolateralis felszínén fokozatosan a hepatocyták apicalis plazmamembránján található **tight junction**-ökhöz (zonula occludens-ZO) migrál. A tight junction egy fehérjékből álló sejtkapcsoló struktúra, melynek feladata az intercellularis terek különválasztása

különböző sejttípusok között (lsd. összefoglalva (224;225)). Ezt a funkciót „barrier”-nek (korlát) hívják, mert a szolubilis molekulák paracellularis transzportját akadályozza meg, így teljesen elhatárolja a sejtek közötti teret (pl. lumenre és intercellularis térre endothel esetén), így pl. potenciónalisán cytopathias anyagok elzárását az arra érzékeny környezettől (pl. az epe canaliculusok lezárása a hepatocytak apicalis felszínén). Egy másik nagyon jelentős feladata a sejtek plazmamembránjának és annak komponenseinek lateralis diffúziójának megakadályozása. Ez a „fence” (kerítés) funkció, mely a polarizált sejtek (pl. hepatocytak) basolateralis és apicalis részének különbözőségét tartja fenn, ezeken a sejtfelszíneken ugyanis más és más anyagok transzportja történik (hepatocytak esetén a canalicularis -apicalis- felszínen történik az epe kiválasztás, a sinusoidalis -basolateralis- felszínen pedig a sinusoidalis vérből történő táp,- és mérgeanyag felvétel). A tight junction alkotói az occludin, a claudinok, illetve a tricellulin. Ezek közül elsőként az occludint fedezték fel 1993-ban (226), majd ezt követően azonosították a claudinokat, melyeknek ma már 24 tagja ismert (227), végül a tricellulint (228), mely onnan kapta a nevét, hogy típusosan három sejt találkozási pontjánál helyezkedik el. Tekintettel arra, hogy a JAM (junctional adhesion molecule) molekulák az előbb említett fehérjék közvetlen közelében helyezkednek el, ezeket is a tight junction fehérjék közé sorolják (229). A tight junction fehérjék extracellularis hurok (extracellular loop- EL) doménjeik révén zipzár-szerűen kapcsolódnak egymáshoz. Az extracellularis terek elválasztásán és a plazmamembrán diffúzió megakadályozásán kívül egyéb funkciót is ellátnak, pl. receptorok (lsd. később), jelátvivő molekulák, vagy különböző anyagok abszorpciójának szabályozói lehetnek (230). A tight junction-höz kapcsolódva a cytoplasmában elhelyezkedő ZO-1, ZO-2, ZO-3, és ZO-1 asszociált protein kinázok (ZAK) az aktin filamentumokkal tartanak kapcsolatot (összefoglalva (231)), ezenkívül különböző jelátviteli utak célfehérjéi (232). A tight junction fehérjék fontos szerepet játszanak a sejtek és epithelium differenciálódásában (233), így a sejtek malignus transzformációjában és a daganatok metastasis képzésében is részt vesznek.

A claudin fehérjecsaldának 24 tagja ismert, melyek a legkülönbözőbb szövettípusokban fordulnak elő (összefoglalva (234)). A **claudin-1** (CLDN-1) minden szövetben előfordul, azonban legnagyobb mértékben a májban expresszálódik (235), elsősorban a hepatocytak apicalis (canalicularis), valamint az epeutak hámsejtjeinek luminalis

felszínén (211). Elengedhetetlenül fontos azonban a bőr hámszövetének intaktságához is, ugyanis azokban a kísérletekben, amelyekben a CLDN-1 génjét kiütötték (knockout) egerekben, az állatok a születést követő első napon belül elpusztultak a bőrön keresztül bekövetkezett drámai mennyiségű folyadékvesztésben (236). Ezek ismeretében nem meglepő, hogy az ichtyosis (elvékonyodott, száraz, gyakran pikkelyes bőrelváltozással társult bőrbetegségek gyűjtőneve) és a primer sclerotizáló cholangitis patomechanizmusában is igazolták a CLDN-1 mutációját (237). A claudinok (csakúgy, mint a többi sejtkapcsoló fehérje) a különböző daganatos kórképek propagációjában is szerepet játszanak, pl. a claudin-3, illetve claudin-4 up-regulálódik petefészek-, emlő-, prosztata-, és hasnyálmirigy-rákokban (238-242). Ellenben a CLDN-1 jellemzően down-regulálódik a különböző daganatokban, pl. colorectalis rákokban és hepatocellularis carcinómában (HCC) a CLDN-1 expresszió csökkenése negatívan korrelál a daganat grádusával és egyben rossz prognózist jelent (243;244). Mint minden claudin fehérje, a CLDN-1 is négy transzmembrán helix-ből, három intracellularis doménből és két extracellularis hurokból (extracellular loop 1, 2 - EL 1, 2) áll (összefoglalva (245)). A claudin-1-ről 2007-ben igazolták, hogy elengedhetetlenül fontos szerepet játszik a HCV sejtbelépésében (246). Amennyiben a CLDN-1-et expresszáltatták olyan sejtvonalakban, melyek egyébként nem fertőzhetőek HCVpp-vel, az exogen expressziót követően képesek voltak felvenni a HCVpp-t, és CLDN-1 ellenes antitesttel az infekciót hatékonyan tudták gátolni (246). A HCV entryben az EL1 régióknak van kulcsfontosságú szerepe (246). A HCV és CLDN-1 közötti direkt interakció a mai napig nem bizonyított (246;247), a CLDN-1 a CD81 co-receptora, erre több adat is utal. Az egyik az, hogy a CLDN-1 és a CD81 immunfluoreszcens kettős festéssel a hepatocyták plazmamembránjának azonos pontján is (döntően canalicularisan) festődtek, ezzel bizonyították a két receptor co-lokalizációját, valamint a CD81-hez kötött HCV migrációját a tight junction-ökhöz (211;212). A CLDN-1 és CD81 közötti asszociáció szintén bizonyított HCV permisszív Huh-7,5 hepatocytákban, és ez az asszociáció a HCVpp-vel fertőzött és naív sejtekben egyaránt fennállt (248). Úgy tűnik, hogy a CLDN-1 sejtkapcsoló struktúrákon kívül elhelyezkedő formája, az ún. non-junctionalis is fontos szerepet játszik a HCV entryben (246;249). Ezzel ellentétes közlések is napvilágot láttak, melyekben polarizált sejtek vizsgálata során úgy találták, hogy a CLDN-1-nek csak a junctionalis formája szerepel HCV receptorként (250). Két

kutatócsoport is vizsgálta, hogy HCV permisszív Huh-7 sejtekben hogyan változik a CLDN-1 expresszió HCVcc infekció hatására, és egymással teljesen ellentétes eredményeket kaptak. Az egyik közlésben magasabb, míg a másikban alacsonyabb expressziós szintről számoltak be, az ellentétes eredményeket az eltérő inkubációs időknél tulajdonították (211;251).

A claudin fehérjecsalád két további tagjáról, a **CLDN-6**-ról, és **CLDN-9**-ről is feltételezik, hogy szerepük van a HCV sejtbelépésében. Az egyik erre utaló adat az, hogy igen nagy szekvencia homológia áll fenn mindkét fentebb említett fehérje és CLDN-1 EL1 régiói között (252), mely domén, mint már korábban említésre került, elengedhetetlen a HCV entryben. Mindezek mellett az egyébként nem HCV permisszív 293T sejtvonalt, miután expresszáztatták benne a CLDN-6-ot és CLDN-9-et, képes volt felvenni a HCVpp-t és HCVcc-t egyaránt (252;253). A CLDN-6-nak és -9-nek eddig azonban csak az RNS-ét sikerült kimutatni májból, illetve PBMC sejtekből (252;254), a fehérje expressziója *in vivo* nem ismert, minden eddigi ismeretünk a HCV sejtbelépésére gyakorolt hatásokról *in vitro* kísérleteken alapszik.

Az utolsó fehérje, mely jelen ismereteink szerint HCV receptorként is funkcionál, az **occludin**. Az occludin, mint már korábban említésre került, sejtkapcsoló fehérje, a tight junction egyik alkotója. Egyre több adat szól amellett, hogy az occludin inkább a tight junctionok területéről induló jelátviteli utak elindításában semmint a paracellularis barrier kialakításában szerepel (255). Számos adat utal arra, hogy az occludin elengedhetetlen a HCV entryben. Elsőként az, hogy az NIH3T3 sejtek, melyek nem fertőzhetőek HCVpp-vel, miután occludint expresszáztattak bennük, felvették azt (205). Továbbá a HCV permisszív Huh-7,5 és Hep3B sejtek (melyek HCV permisszívek) nem voltak képesek felvenni a HCVpp-t és HCVcc-t, amennyiben az occludin expresszióját gátolták bennük (205). A CD81 mellett az occludin a másik HCV receptor, mely a HCV faj specificitását okozza, és ezért a fehérje második extracelluláris hurok régiója (extracellular loop 2- EL2) felelős (205). A CD81 és occludin szerepét a HCV fajspecificitásában állatkísérletes modellben is sikerült igazolni (256). Direkt kötődés a HCV envelope fehérjéihez csakúgy, mint a CLDN-1-nél, az occludin esetében sem bizonyított, habár HCVcc modellben co-immunprecipitációs vizsgálattal felmerült az E2 glikoproteinnel való asszociációja (251). *In vitro* úgy találták, hogy az occludin expressziója csökken Huh-7,5 sejtekben, miután HCVcc-vel fertőződtek, ezzel

megakadályozandó a további felülfertőződést (251). A glukokortikoidok *in vitro* növelik a Huh-7,5 sejtek fogékonyságát a HCVcc és sHCV fertőzés iránt, egyúttal fokozzák az occludin és SRB1 expresszióját (257). Tekintettel arra, hogy a szteroidok a transzplantációt követő bázis immunszuppresszió részei, szerepük a HCV rekurrenciában a fenti mechanizmus révén is érvényesülhet, habár *in vivo* adatokkal ezt eddig még nem támasztották alá.

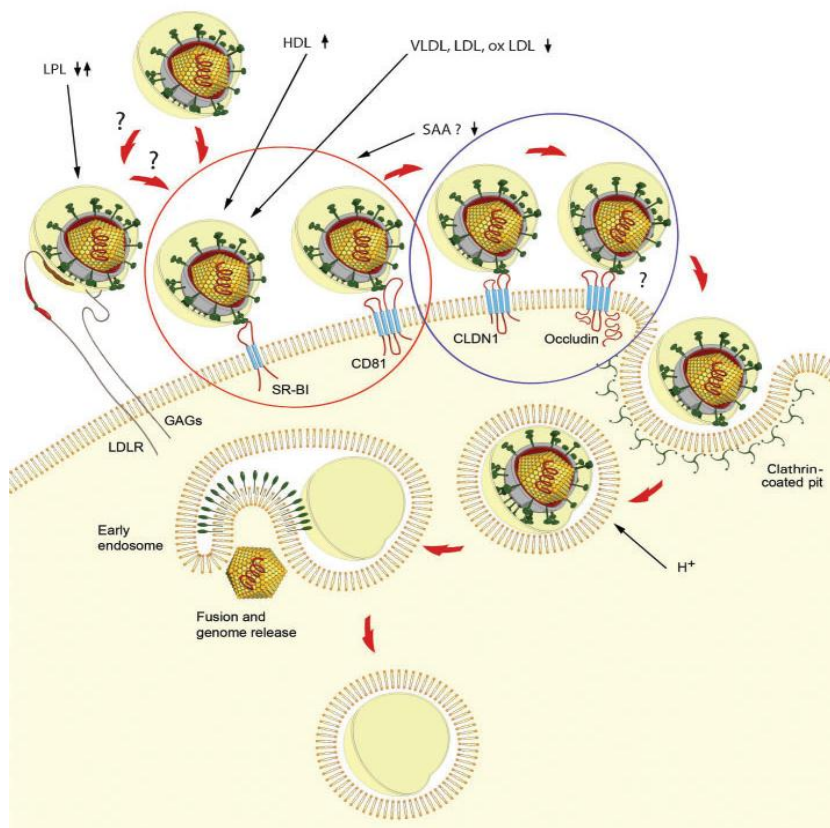
Miután a HCV a vírusreceptorokkal történt interakció útján a májsejtek canalicularis felszínéhez migrált, a tight junction-ök területén belép a sejtbe clathrin-mediált endocytosis révén (258). Ebben a folyamatban részben szerepet játszik a vírus E1-E2 glikoprotein komplexe, az envelope fehérje 1 és 2 ugyanis II-es típusú fúziós fehérjék, szerepük van a membrán pórus kialakításában (23;259). Az internalizáció alatt a CD81-CLDN-1 komplex asszociációját tételezték fel a HCV-vel (260). Tekintettel arra, hogy a CLDN-1 a CD81 co-receptora (Izd. korábban), a két fehérje kapcsolatának megakadályozása az endocytosist is gátolja, és ebben szerepe van a protein-kináz A-nak (PKA) (261). A PKA a fehérjék transzportját szabályozza az endoplazmatikus retikulumból a Golgi apparátusba és onnan tovább a plazmamembrán felé (262). A PKA működésének megzavarása két mechanizmus révén is gátolhatja a HCV sejtbejutását: egyrészt a CLDN-1 transzportja gátlódik a plazmamembrán felé és így nem tud létrejönni a vírus plazmamembránban történő migrációjához és később az endocytosishoz elengedhetetlen CD81-CLDN-1 komplex; másrészt a lipoprotein exkréció gátlásával csökken a magas infektivitású VLP partikulumok aránya a vérben (261). Tekintettel arra, hogy a CLDN-1-nek extrajunkcionalis formája is ismert (211), az endocytosis nem kizárólagosan a tight junctionök területén, hanem a májsejtek sinusoidalis felszínén is bekövetkezhet (261).

A hepatitis C vírus nemcsak a vér útján juthat el a májsejtekhez, direkt sejt-sejt infekciót is kimutattak (263). Erre abból következtettek, hogy HCVcc képes volt megfertőzni a monolayer alkotó szomszédos Huh-7,5 sejteket a vírusreceptorok ellen termelt neutralizáló antitestek jelenlétében is (263). Ebben a folyamatban a CLDN-1, CD81 és SR-B1 szerepe egyaránt felmerült (263-265).

A HCV entry folyamatát mutatja összefoglalva a 3. ábra.

3. ábra- A Hepatitis C vírus bejutása a hepatocytakba (forrás: Burlone ME and Budkowska A- Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. J Gen Virol, 90, 1055-1070 (2009))

A HCV a vérben lipoproteinekhez kötődik, a májsejtek felszínéhez a sinusoidalis véren keresztül jut el. A lipoproteinhez asszociált HCV-t először a sinusoidok endothel sejtjeinek, illetve a májsejtek felszínén lévő lectinek (nincs ábrázolva), majd a májsejt basolateralis felszínén megtalálható további, ún. „horgonyzó” receptorok (glükóz-aminoglikánok-GAG, lipoprotein-lipáz-LPL, LDL-receptor) kötik meg. Ezáltal a HCV fizikai közelségbe kerül az entry további folyamatában szereplő magas affinitású receptorokkal. Ezek közül elsőként az SR-B1 és CD81 kerül kapcsolatba HCV-vel, egy komplex alakul ki, mely migrál a hepatocytá canalicularis felszíne felé. A CLDN-1, mint CD81 co-receptor ebben a folyamatban is szerepet játszik. A tight junction-ök területére eljutva a HCV endocytosis révén bejut a sejtbe. A membrán fúzió nem jöhet létre CLDN-1 és CD81 hiányában. Két további sejtkepcsoló fehérje (az occludin, és a CLDN-6-utóbbi nincs ábrázolva-) elengedhetetlen a HCV sejtbelépésében, szerepük pontosítása még várat magára.



Munkám során vizsgáltam a CLDN-1, CLDN-6, occludin és CD81 receptorok expressziós változásait a HCV rekurrencia idején, valamint az antivirális kezelés után.

4. Célkitűzések

- **Vizsgálni, hogy marginális donorból származó máj beültetése, illetve magas rizikójú recipiens transzplantációja után magasabb-e a szövődmények aránya, rosszabb-e a túlélés, gyakrabban, illetve hamarabb következik-e be a HCV kiújulás, valamint van-e különbség a HCV rekurrencia progressziójában.**
- **Vizsgálni, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően a magyar beteganyagban is rontja-e a túlélést a de novo diabetes mellitus kialakulása, gyakrabban alakul-e ki HCV cirrhosis miatt májátültetett betegekben, előrejelzi-e a HCV kiújulást, valamint súlyosbítja-e a HCV rekurrencia kórlefolyását.**
- **Vizsgálni hogy a HCV rekurrencia során, valamint az erre adott antivirális kezelés hatására változik-e a receptorok expressziója a májszövetben.**
- **A HCV rekurrencia idején mért vírusreceptor expressziók alapján a már eddig azonosított, SVR-re prediktív faktorok mellett újak keresése.**
- **Igazolni a CLDN-6 fehérje expressziót emberi májszövetben.**

5. Betegek és módszer

5.1. A donor-recipiens párosítás májátültetés utáni eredményekre gyakorolt szerepét az alábbi beteganyagon és módszerrel vizsgáltuk:

A 2003. január és 2009. szeptember között cadaver donoros májátültetésen átesett 260 beteg adatait elemeztük retrospektíve. A donorok átlagos életkora 39 év volt. 124 esetben férfi, míg 136 alkalommal női donorból származó teljes máj átültetésére került sor. A donorok átlagos testtömeg-indexe $23,6 \text{ kg/m}^2$ volt. Az agyhalál okait az 1. táblázat mutatja.

1. Táblázat- A 2003 és 2009. szeptember között agyhalottá vált donorok megoszlása az agyhalál okai szerint.

A táblázat csak azokat a donorokat mutatja, melyekből megtörtént a máj eltávolítása és az alkalmas is volt a beültetésre.

Agyhalál oka	Esetszám (N=260)	Százalékos gyakoriság (%)
Subarachnoidealis vérzés	142	54,6
Koponya trauma	89	34,2
Stroke	20	7,7
Hypoxia (akasztás)	2	0,8
Hypoxia (egyéb okból)	6	2,3

Az agyhalál leggyakoribb oka a subarachnoidealis vérzés volt, melyet gyakoriságban a koponya trauma követett. A máj perfúziója 136 alkalommal (52,3%) UW oldattal, 121 esetben (46,5%) HTK-val, és egy esetben (0,4%) Eurocollins-al történt. A 2. táblázat az ECD kritériumokat tartalmazza. Egy donort legalább két kritérium teljesülése esetén tekintettünk marginálisnak. Amennyiben egyszerre több májenzim is kórosan magas volt, akkor is csak egy ECD pontszámot kapott a donor, tehát a májenzimeket egy csoportban kezeltük. Ezalapján 112 esetben került sor marginális máj (BAD csoport)

beültetésére, míg a fennmaradó 148 műtét során optimális máj (GOOD csoport) beültetésére került sor.

2. Táblázat- Marginális donor kritériumok.

Egy donor esetén több kritérium is teljesülhetett, ezért a teljesült kritériumok száma több, mint a marginálisnak tekintett donorok száma.

Marginális donor kritériumok	Donorok száma, akikben az adott feltétel teljesült (N)
Donor életkor > 60 év	8
Donor BMI > 27 kg/m ²	36
Intenzív osztályon töltött napok száma > 3 nap	44
Dopamin > 10 µg/kg/min, vagy kombinált keringéstámogatás (dopamin+ norepinephrine)	47
Újraélesztés/ tartós hypotensio > 1 óra, RR < 80 Hgmm	44
Donor se AST/ALT > 40 (U/L)	59
Donor se bilirubin > 17 µmol/L	60
Donor GGT > 60 U/L	29
Donor se Na > 156 mEq/L	49

A recipiensek átlagos életkora 45,6 év volt, a betegek átlagos testtömeg-indexe 25,8 kg/m² volt. A 260 májátültetésből 12 esetben retranszplantációra került sor. A májátültetés három leggyakoribb indikációja a HCV cirrhosis (N=99, 38,1%), ALD cirrhosis (N=43, 16,5%) és a PSC (N=28, 10,8%) volt. Az átlagos meleg ischaemiás idő (WIT) 58,2 perc, a hideg ischaemiás idő (CIT) átlagosan 475 perc volt. A hideg ischaemiás idő a donorműtét során az aorta lefogása (tehát a máj perfúziójának kezdete) és a donormáj hűtőfolyadékából történő kivétele között eltelt idő percekben. A meleg ischaemiás idő a beültetésnek a cirrhoticus máj eltávolítása (hepatectomia) után következő szakasza, amely a donormáj hűtőfolyadékából történő kivétele és szisztémás reperfüziója között eltelt idő percekben.

213 beteg (81,9 %) tacrolimus, 38 beteg (14,6 %) pedig cyclosporin (CyA) alapú immunszuppresszív kezelést kapott. 25 beteg (9,6%) kivételével a recipiensek mycophenolat-mofetil is kaptak. A prednisolon dózisát a közvetlen posztoperatív szakot követően fokozatosan csökkentett dózisban kapták. A betegek transzplantáció előtti utolsó MELD pontszámainak átlagértéke 14,3 volt. A recipienseket az alapján csoportosítottuk, hogy a MELD pontszámuk meghaladta-e a 17-et. Ez alapján osztottuk őket jó (GOOD csoport, N=177) és rossz (BAD csoport, N=83) általános állapotúra. Így összesen 4 csoportot alkottunk aszerint, hogy a jó/rossz állapotú betegek marginális májat kaptak-e (3.táblázat). Ezekben a csoportokban vizsgáltuk meg a kumulatív graft-, és betegtúlélést, valamint a posztoperatív szövődmények gyakoriságát. A szövődmények közül a máj csökkent működését (initial poor function-IPF) az alábbiak szerint definiáltuk: a posztoperatív ötödik napon a szérumbilirubin és prothrombin hányadosa nagyobb, mint egy.

3. Táblázat- Donor-recipiens párosítás.

A donorok abban az esetben minősültek optimálisnak (GOOD), ha 0, vagy 1 ECD kritérium teljesült csak az esetükben. Amennyiben 2-nél több kritérium is teljesült, marginális (BAD) csoportba kerültek. A recipiensek akkor minősültek jó általános állapotúnak (GOOD), ha a transzplantáció előtti utolsó MELD pontszámuk nem érte el a 17-et. Ennél nagyobb MELD pontszám esetén rossz általános állapotúnak (BAD) tekintettük őket.

Donor-recipiens párosítás	Esetszám (N=260)	Százalékos gyakoriság (%)
GOOD/GOOD (G/G)	102	39,2 %
BAD/BAD (B/B)	37	14,2 %
BAD/GOOD (B/G)	75	28,8 %
GOOD/BAD (G/B)	46	17,8 %

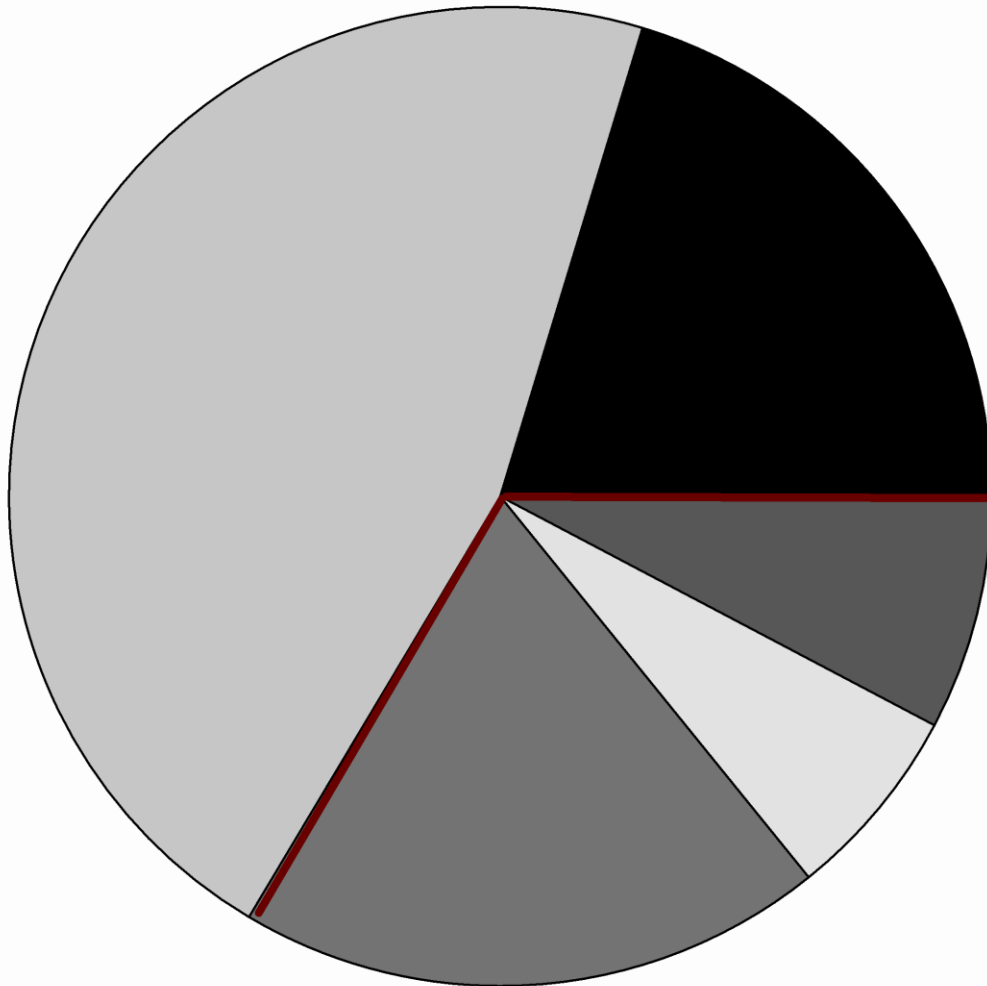
5.2. A hepatitis C vírus és a májátültetés után fellépő de novo diabetes mellitus közötti kapcsolatot az alábbi beteganyagban és módszerrel vizsgáltuk:

1995 és 2009. január között májátültetésen átesett betegek adatait vizsgáltuk retrospektív módszerrel, összesen 310 beteg adatait dolgoztuk fel. Kizártuk a vizsgálatból azokat a betegeket, akik már a májátültetés előtt is cukorbetegségben

szenvedtek (60 beteg). Kizártuk továbbá azokat a betegeket is, akiknél a májátültetés után emelkedett éhomi vércukor (impaired fasting glycaemia-IFG: az éhomi vércukor értéke 6,1-6,9 mmol/l) igazolódott (24 beteg), valamint azokat a betegeket is, akiknél a szénhidrát háztartás zavara a májátültetés utáni első 2 hónapon belül rendeződött (transziens-diabetes mellitus- T-DM, 20 beteg). De novo diabetes mellitusként (new onset diabetes mellitus-NODAT) definiáltuk a májátültetés utáni harmadik hónapot követően is permanensen fennálló cukorbetegséget (éhomi vércukor > 7 mmol/l és/vagy random vércukor > 11,1 mmol/l és/vagy tartós igény antidiabetikus kezelésre). NODAT-ot 63 betegben (20,3%) állapítottunk meg. A vizsgálatban bennmaradó további 143 beteg alkotta a kontroll csoportot. A betegek fenti megoszlását ábrázolja a 4. ábra. A továbbiakban már csak a vizsgálatba ténylegesen beválogatott 206 beteg adatait elemzem. A recipiensek közül 105 nő (51%) és 101 férfi (49%) volt. A betegek átlagos életkora 40,5 év volt. A májátültetés fő indikációi a HCV cirrhosis (N=77; 37%), a PSC (N=31; 15%) és az ALD cirrhosis (N=25; 12%) volt. Nyolc esetben (4%) retranszplantációra került sor. Az átlagos CIT idő 482 perc, a WIT 56 perc volt. 137 beteg (66,5%) tacrolimus, míg 69 beteg (33,5%) cyclosporin alapú immunszuppresszióban részesült, 177 beteg (86%) mycophenolat-mofetil is kapott. A betegek emellett fokozatosan csökkenő dózisban per os prednisonolt is kaptak. A szövődmények közül a PNF összesen 3 betegnél (1,4%) jelentkezett, míg IPF (definícióját lásd az előző fejezetben) 34 betegnél lépett fel. A műtétet követően akut rejekció 67 esetben (32,5%) jelentkezett, szteroid lökéskezelésben (1g/nap methylprednisolon iv., 3 egymást követő napon) 56 beteg (27,2%) részesült. A de novo diabetes mellitussal diagnosztizált betegek közül 3 beteg (4,7%) csak diétán volt tartva, 13 beteg (20,6%) orális antidiabetikumot kapott, míg 47 beteg (74,6%) inzulin kezelésben részesült. A HCV pozitív betegek májbiopsziás protokollját, valamint az antivirális kezelés menetét a következő fejezetben tárgyalom.

4. ábra- A szénhidrát háztartás zavarainak megoszlása a vizsgált 310 májátültetett betegben.

NODAT: de novo diabetes mellitus. PreOLT DM: azok a májátültetésen átesett betegek, akiknél már a műtét előtt is imsert volt a diabetes mellitus. T-DM: tranziens diabetes mellitus. IFG: impaired fasting glicemia (emelkedett éhomi vércukor).



■	NODAT (N=63)
■	KONTROLL (N=143)
■	PreOLT DM (N=60)
■	T-DM (N=20)
■	IFG (N=24)

5.3. A hepatitis C vírus sejtbelépéséhez szükséges receptorok vizsgálatát az alábbi beteganyagon és módszerrel végeztük:

28 HCV pozitív, felnőtt májtranszplantált beteget vontunk be vizsgálatainkba. A betegek 2003 és 2007 között estek át a májátültetésen a SE Transzplantációs és Sebészeti Klinikán. A betegek között 10 nő (35,7 %) és 18 férfi volt (64,3 %), átlagéletkoruk 50 év volt.

20 beteg (71,4 %) tacrolimus, 8 beteg (28,6 %) pedig cyclosporin alapú immunszuppresszív kezelést kapott, mycophenolat-mofetillel történő kombinációban. A prednisonon dózisát a közvetlen posztoperatív szakot követően fokozatosan csökkentették, majd elhagyták.

A májenzimek (AST, ALT, bilirubin, GGT, ALP) napi rendszerességgel voltak monitorizálva az első két hétben, majd havonta egyszer az első posztoperatív év során, illetve soron kívül, ha a beteg panaszossá vált. A HCV rekurrencia minden esetben bekövetkezett, 22 esetben a műtétet követő egy éven belül (78,6 %). A vírus kiújulás minden esetben szövettanilag is igazolva lett, az ehhez alapul szolgáló májbiopsziát a vírusrekurrenciára utaló klinikai tünetek és/vagy rutin laborvizsgálat során észlelt emelkedett májenzimek miatt vették a Klinika radiológusai.

A betegek csak szövettanilag igazolt hepatitis esetén kezdték el kapni az antivirális kezelést. A szövettani vizsgálat során a hisztológiai aktivitási indexet (HAI), valamint a fibrosis súlyosságát jelző fibrosis score-t adta meg a patológus. A vizsgálatba bevont betegek mindegyike kombinációban kapta a PEG-IFN-t ribavirinnel, 12 hónapon keresztül, megszakítás nélkül. A kezelés tolerálhatósága érdekében a betegek fokozatosan emelkedő dózisban kapták az interferont és ribavirint, annak függvényében, hogy a kezelés megszakítását indokló mellékhatás (neutropenia, thrombocytopenia, anémia, depresszió) jelentkeztek-e, vagy sem. Egyik beteg sem kapott erythropoetint, illetve granulocytá-macrophag colonia stimuláló faktort (GM-CSF). A kezelés során egyik betegnél sem alakult ki transzfúziót igénylő anémia. A kezelés hatására 11 beteg (39,3%) vírusmentessé vált a terápia végére, azaz elérte az ún. end-of-treatment response-t (ETR). Ebből a 11 betegből hat a kezelést követő 24 hét múlva is vírusmentes maradt, azaz elérte a tartós vírusmentességet (SVR). A kezelés végén (tehát

a kezelés megindítása után egy évvel) ismételt biopsziavétel történt, tehát minden betegről rendelkezésünkre állt egy kezelés előtti és utáni biopszia.

13 normál májban is vizsgáltuk kutatásunk során a HCV receptor expressziókat, ehhez a mintákat donorműtétek során vettük a később beültetésre került májából, még az aorta lefogás, tehát a perfúzió megindítása előtt. Mind a májátültetett betegekből származó májbiopsziák, mind a donormájából vételezett minták 10%-os pufferolt formalinban lettek fixálva és paraffinba lettek ágyazva. A májbiopsziákat a diagnosztikum keretein belül végzett szövettani vizsgálat után dolgoztuk fel. A májbiopsziák vételezésével párhuzamosan HCV kópiaszám mérés is történt a betegek véréből (IU/ml), a mérés RT-PCR-al történt (Cobas TaqMan 48 (Roche), Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test Kit).

Vizsgálatunk során a CLDN-1, CLDN-6, CD81 és occludin molekulák expresszióit mértük mind RNS (RT-PCR-al), mind fehérje szinten (immunhisztokémiával). A kutatást két lépcsőben végeztük. Először csak 12 beteg májbiopsziás mintáit dolgoztuk fel, és a CLDN-1 expressziót az alábbi csoportosítás szerint vizsgáltuk: non-responderek (6 beteg), illetve ETR-t elérő betegek (szintén 6 beteg, kettő később tartósan vírusmentes lett). Második lépésben bővítettük ki a mintaszámot 28 betegre, emellett normál mintákat is feldolgoztunk, és a CLDN-1 mellett már a CLDN-6, CD81 és occludin expressziókat is mértük. Tekintettel arra, hogy az első vizsgálatba bevont 12 beteg részét képezi a kibővített kutatás során vizsgált 28-nak, az egyszerűség kedvéért nem részleteztem fentebb külön ezeknek a betegeknél a klinikai adatait, hanem csak a teljes beteganyagra koncentráltam. A kutatás második részében non-responderekre (22 beteg) és SVR-re (6 beteg) osztottuk a betegeket. Az első vizsgálatban szereplő 6 ETR-t elérő betegből négy tehát átkerült a non-responder csoportba a második lépcsőben történt vizsgálat során, hiszen fél évvel a kezelés után már nem voltak vírusmentesek.

5.3.1. RNS izolálás és RT-PCR:

Az RNS izolálást a QIAGEN FFPE kit-el végeztük a gyártó protokollja alapján (letölthető a <http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rneasyystem/rneasyffpekit.aspx#Tabs=t2> webcímről, az RNeasy FFPE Handbook-English fülről kattintva), majd az izolált RNS-t -80°C-on tároltuk. Az RNS-t ezt követően cDNS-re

írtuk át a High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems – ABI, Foster City, Calif, USA) használatával, szintén a gyártó protokollja alapján. A real-time PCR kivitelezése 2x Sybr Green Master Mix (ABI, AB4309155) használatával történt, a reakciókat 20 µl össztérfogatba mértük össze, a primer koncentrációk 25 µmol/l-ek voltak, reakciónként 50 ng cDNS-t mértünk be és a polimeráz láncreakció AB 7000 real-time PCR System (Applied Biosystems) gépben lett lefuttatva.

Az alábbi primereket használtuk a reakciókhoz:

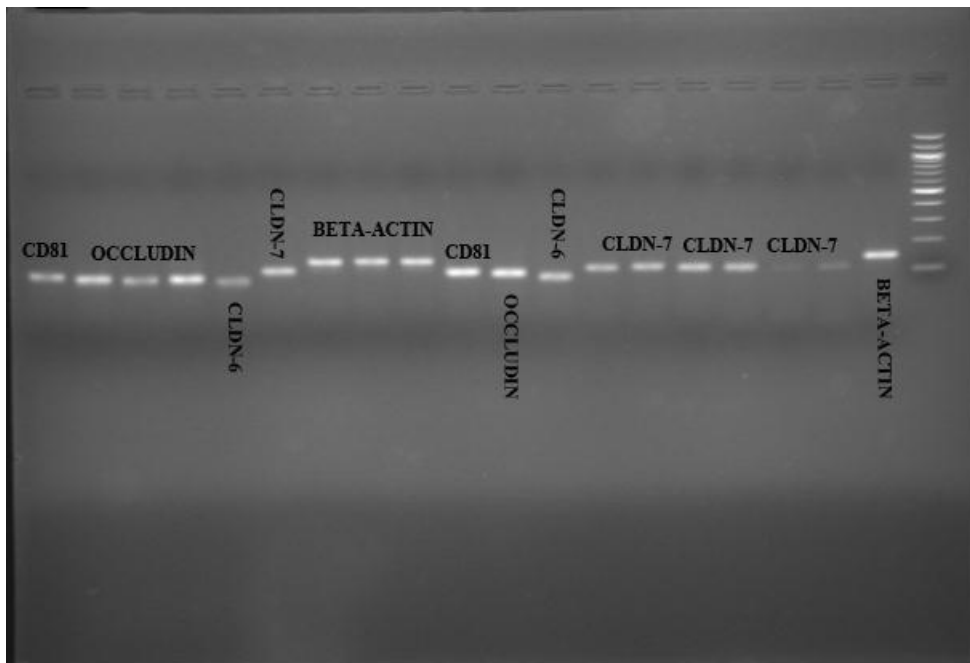
- CLDN-1 forward: 5'-GTG CGA TAT TTC TTC TTG CAG GTC-3', reverse: 5'-TTC GTA CCT GGC ATT GAC TGG-3'
- CLDN-6 forward: 5'-TGG ATC TTG ACA TGC CCA TCT T-3', reverse: 5'-AGT CTG TCT TGT TGC AAA GCC A-3'
- CD81 forward: 5'-ACG AGA CGC TTG ACT GCT GTG-3', reverse: 5'-TGA AGA GGT TGC TGA TGA TGT TGC-3'
- occludin forward: 5'-CGG TCT AGG ACG CAG CAG AT-3', reverse: 5'-AAG AGG CCT GGA TGA CAT GG-3'
- Beta-actin forward: 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3', reverse: 5'-GGG CCG GAC TCG TCA TAC-3'.

A primerek úgy lettek tervezve, hogy kb. 100 bázispárnyi nucleotide szakasz amplifikálódjon a PCR reakció során. Minden egyes reakciót duplikátumban mértünk be, a két mérés eredményét átlagoltuk. A reakcióelegyeket plate-ekre mértük be, minden egyes plate-en steril vizet használtunk negatív kontrollként és egy, a fenti vírusreceptorokat ismertén expresszáló human hepatocellularis carcinoma mintát pozitív kontrollnak. Hígítási sort készítettünk 1x-es, 10x-es és 100x-os koncentrációkkal, melyekből meghatároztuk a PCR reakció hatékonyságát (ellentétben a TaqMan reakciókkal Sybr Green esetén nem garantált az amplifikált DNS szakasz mennyiségének ciklusonkénti megkétszereződése). A PCR gép beállításai az alábbiak voltak: 2 perc 50 °C-on, majd 10 perc 95 °C-on iniciációs lépésnek (Hot Start), majd 40 ciklus ismétlődve, ciklusonként 95 °C 30 másodpercig, 60 °C (anellálási hő) 30 másodpercig, 72 °C 45 másodpercig. A 40. ciklus után a terminációs lépés 37 °C 10 másodpercig volt. Az anellálási hő gradiens PCR-al határoztuk meg minden primer esetében, a legoptimálisabb 60 °C-ot alkalmaztuk a RT-PCR során. A reakció befejeztével disszociációs görbe elemzést végeztünk, majd megfuttattuk az amplifikált

termékeket agaróz gélen és így ellenőriztük az amplifikáció specificitását. Az 5. ábra egy kifotózott agaróz gélt mutat, melyen a molekulaméret szerint különböző távolságra „futott” HCV receptorok látszanak egy ismert méretű nucleotid szakaszokat tartalmazó referencia minta („létra”) mellett. A RT-PCR eredményeit relatív expresszióban adtuk meg, az ehhez szükséges számításhoz referencia génnek beta-actint használtunk. A relatív expressziót az 6. ábrán levezetett egyenletek alapján számítottuk ki.

5. ábra- Gélfuttatás eredménye.

A különböző termékek molekulaméretüktől függően szeparálódnak a gélen. A gél jobb oldalán látszik a megfuttatott létra, mely 100 bázispáronként emelkedő méretű nucleotide szekvenciákat tartalmaz. A gélen legmesszebbre a legkisebb méretű termékek futnak, tehát a létra alján 100 bp-nyi méretű DNS szakasz látható, majd felette 200, 300 stb. A létrához való viszonyítással lehet beazonosítani az ismert méretű, amplifikált termékeinket. A képen látható a CLDN-7 is, mely nem került be a jelen dolgozatba, ugyanis nem HCV receptor.



6. ábra- A relatív expresszió számítása.

Az endogén kontroll jelen esetben a referencia génként használt beta-actin. A target gén a vizsgált gén, azaz valamelyik HCV receptor. A dCT-t mind a vizsgált mintára (pl. non-responder beteg kezelés előtti májbiopsziás mintája), mind a kalibrátor mintára (jelen esetben a pozitív kontrollként használt HCC minta) ki kell számolni. A relatív expressziót úgy kapjuk meg, ha a target és kalibrátor mintákra számolt dCT-eket kivonjuk egymásból, majd ezt a 2 hatványára emeljük negatív előjellel.

step 1: Normalization to endogenous control

$Ct_{\text{Target gene}} - Ct_{\text{Endogenous control}} = dCt$

Do both for calibrator and samples

step 2: Normalization to calibrator sample

$dCt_{\text{Sample}} - dCt_{\text{Calibrator}} = ddCt$

step 3: use the formula

2^{-ddCt}

5.3.2. Immunhisztokémia:

A paraffinba ágyazott mintákból 3-4 µm vastag metszetek lettek készítve, melyeket Benchmark XT automatában festettünk avidin-biotin peroxidase technikával, diaminobenzidine chromogen használatával. A gyártó által forgalmazott reagenseket a javasolt metodika alapján alkalmaztuk (Ultra view Universal DAB detection Kit, Ventana). A primer antitestek az alábbiak voltak:

- CLDN-1 ellen termelt nyúl-polyclonalis antitest (1:100-hoz hígításban, 32 percig, Lot.: 624568A, Zymed, San Francisco, Calif, USA)
- CLDN-6 ellen termelt nyúl-polyclonalis antitest (1:100-hoz hígításban, 60 percig, Lot.: 922828, Abcam)
- CD81 ellen termelt nyúl-polyclonalis antitest (1:1000-hez hígításban, 32 percig, Lot.:B41536, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Occludin ellen termelt nyúl-polyclonalis antitest (1:200-hoz hígításban, 32 percig, Lot.:913843A, Invitrogen, Camarillo, Calif, USA).

A deparaffinálást Ventana EasyPrep oldattal végeztük a gyártó leírása szerint. Az antigén feltárás Ventana CC1 oldattal történt, 30 percig CLDN-1 és CD81 esetén, valamint 90 percig CLDN-6 esetén. Az occludin feltárása fehérje emésztéssel történt, Ventana proteináz 1 oldattal 4 percen át. Maga a festés UltraView Universal DAB Detection Kit-el (mely DAB inhibitort-3% H₂O₂-, HRP Multimer-másodlagos antitestet - 50 ug/ml koncentrációban 8 percig-, DAB Chromogent -0,2% DAB-, DAB H₂O₂-t -0,04% H₂O₂-, valamint DAB rézoldatot -CuSO₄ 5 g/l- tartalmaz) történt. Human HCC mintát használtunk pozitív kontrollnak a CLDN-1, CD81 és occludin esetén, valamint humán neonatalis vesét a CLDN-6-hoz. Negatív kontroll esetén elhagytuk az elsődleges antitestet, csupán az antitest hígító oldatot adtuk a metszethez. Legalább 10, egymással nem átfedő, a vizsgált metszetet reprezentáló látóteret fotóztunk ki az értékelés során. A fehérje expresszió kvantitálása Leica Qwin Pro 3.1 software-el történt (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK).

5.4. Statisztikai analízis:

SPSS-t (SPSS, 15-ös verzió, Inc., Chicago, Ill) használtunk a statisztikai elemzéshez. A folytonos változókat a szövegben átlagban és standard deviációban adtuk meg, az ábrákon az átlagot és standard error of mean-t ábráztuk. Student *t*-próbát, ANOVA tesztet (Scheffe és Bonferroni posthoc tesztekkel), valamint Mann-Whitney *U*-tesztet használtunk az uni-, és multivariánciás vizsgálatokhoz, a változók homogenitásának (Levene teszt) vizsgálatát követően. A folytonos változók közötti kapcsolatot korreláció elemzéssel vizsgáltuk, Pearson korrelációs koefficiens használatával. A kumulatív graft-, és beteg túléléseket Kaplan-Meier analízissel vizsgáltuk. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$.

6. Eredmények

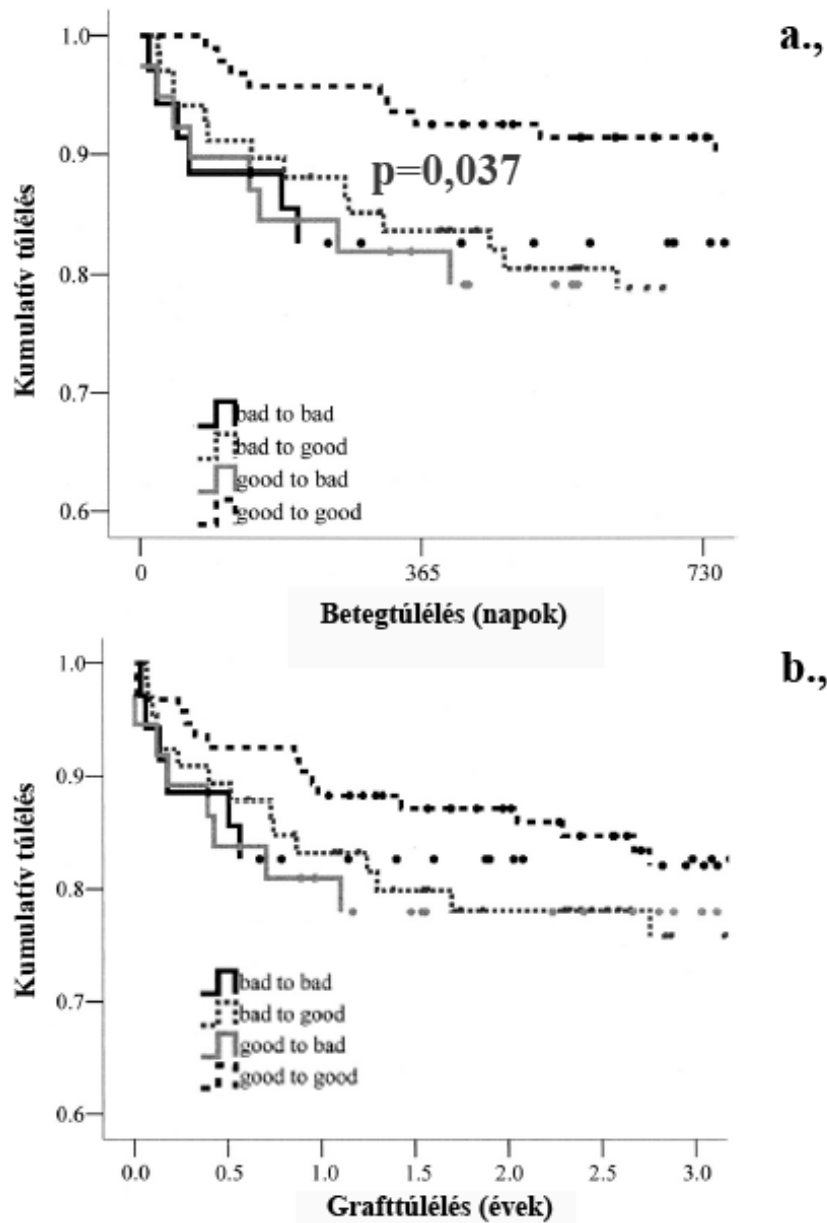
6.1. A donor-recipiens párosítás hatása a májátültetés utáni eredményekre:

A 7. ábrán látható a különböző donor-recipiens csoportok kumulatív beteg- és grafttúlélése. A G/G csoportban az 1, 3 és 5 éves betegtúlélés 93%, 86% és 83%, ugyanez a B/G csoportban 84%, 79% és 75,5%, a G/B csoportban 82%, 79% és 72%, a B/B csoportban pedig 83%, 83% és 83% volt. Az első posztoperatív évben a G/G csoporthoz képest csökkent betegtúlélést észleltünk a többi csoportban ($p=0,037$), a 3 és 5 éves betegtúlélések közötti különbség nem volt szignifikáns. Ugyancsak nem találtunk szignifikáns különbséget a grafttúlélésekben. A G/G csoportban az 1, 3 és 5 éves grafttúlélés 88%, 82% és 79%, a B/G csoportban 83%, 76% és 73%, a G/B csoportban 81%, 78% és 72%, míg a B/B csoportban 83%, 83% és 83% volt.

A recipiensek életkora, a nemek aránya, a CIT és WIT idők, a műtéti idők hossza, valamint az indikációk nem különböztek szignifikánsan az összehasonlított csoportok között. A posztoperatív szövődmények arányát, valamint a perioperatív adatokat a 4. táblázat mutatja. Azokhoz a betegekhez képest, akik alacsony MELD pontszám mellett lettek transzplantálva és optimális májat is kaptak, szignifikánsan több időt töltöttek el az intenzív osztályon a műtétet követően azok a rossz állapotú betegek, akik optimális májat kaptak, de azok a jó állapotúak is, akik marginálisat ($p=0,006$ és $p=0,05$). Azok a magas MELD pontszámú betegek, akik marginális májat kaptak (B/B), a többi beteghez képest a májátültetés alatt, valamint a műtét utáni időszak során több vörösvértest koncentrátumot kaptak, de a különbség nem volt szignifikáns. A G/G csoporthoz képest az IPF nagyobb arányban fordult elő a B/B és a G/B csoportban ($p=0,002$ és $p=0,013$). A posztoperatív szisztémás fertőzések, a vérzéses szövődmények, valamint a veseelégtelenség gyakorisága magasabb volt a magas MELD pontszám mellett transzplantált betegekben a relatíve stabil májfunkciójú betegekhez képest, emellett ECD máj beültetése is jelentősen emelte ezeknek a szövődményeknek az arányát. A posztoperatív első 6 hónapban mért legmagasabb HCV titert, valamint a HCV rekurrencia gyanújakor vett biopsziában mért HAI score-t érdemben nem befolyásolta a recipiens állapota és a beültetett máj minősége, ugyanígy a HCV rekurrencia ideje sem különbözött szignifikánsan a különböző csoportok között (legutóbbi nincs ábrázolva).

7. ábra- A marginális donormájjak és a recipiensek MELD pontszámának hatása a kumulatív beteg-, és grafttúlélésre (Kaplan-Meier ábrák).

A betegtúlélés (a.) napokban, a grafttúlélés (b.) években van ábrázolva. A p érték a posztoperatív első évre levetített betegtúlélésre vonatkozik. A grafttúlélésben nincsenek szignifikáns különbségek.



4. Táblázat- A perioperatív adatok és posztoperatív szövődmények aránya a donor-recipient párosítás vonatkozásában.

A táblázat a folytonos változókat átlagban és szórással, a kategorikusakat esetszámmal és a csoport egészéhez viszonyított százalékos arányával mutatja. Vvt: vörösvértest. IPF: initial poor function. Infekciók: a májátültetést követően jelentkező szisztémás fertőzések. Vérzések: többségében hasúri haematomák. HCV PCR: a májátültetés utáni első 6 hónapban mért legmagasabb HCV titer. HAI: hisztológiai aktivitási index, melyet májbiopsziás mintában mértek.

Perioperatív adatok, szövődmények	G/G csoport (N=102)	B/B csoport (N=37)	B/G csoport (N=75)	G/B csoport (N=46)	p
Recipient ITO-n töltött napjainak száma	8 +/- 5	11 +/- 14	11 +/- 14	18 +/- 28	0,006, G/G vs. G/B 0,05, G/G vs. B/G
Perioperatív vvt transzfúziók (E)	14 +/- 12	28 +/- 25	12 +/- 12	19 +/- 14	NS
IPF	10 (10%)	13 (35%)	13 (17%)	14 (30,5%)	0,002, G/G vs. B/B 0,013, G/G vs. G/B
Infekciók	17 (16,5%)	13 (35%)	15 (20%)	10 (22%)	NS
Vérzések	21 (20,5%)	17 (46%)	26 (35%)	21 (45,5%)	0,01, G/G vs. B/B
Veseelégtelenség	5 (5%)	15 (40,5%)	18 (24%)	21 (45,5%)	0,001, G/G vs. B/B
HCV PCR (10 ⁶ IU/mL)	9 +/- 16	9 +/- 7	15 +/- 27	6 +/- 7	NS
Posztop. 6. hónapban mért HAI	3,2 +/- 1,7	2,6 +/- 1,7	2,7 +/- 1,6	2,4 +/- 2	NS

6.2. A hepatitis C vírus kapcsolata a májátültetés után fellépő de novo diabetes mellitussal:

Magasabb testtömeg-indexű, valamint férfi donorokból eltávolított máj beültetése után magasabb arányban alakult ki a műtétet követően de novo diabetes (5. táblázat). A de novo diabetes mellitus ugyancsak szignifikánsan gyakrabban jelent meg idősebb, elhízottabb és férfi recipientekben (5. táblázat). A NODAT megjelenését nem befolyásolta a hideg és meleg ischaemiás idő hossza, az alkalmazott immunszuppresszív kezelés típusa (nem volt szignifikáns különbség a NODAT és kontroll csoport között a tacrolimussal és cyclosporinnal kezelt betegek számában). A posztoperatív

szövődmények közül nem volt gyakoribb sem a PNF, sem az IPF de novo diabetes kialakulása után. Ugyancsak nem volt szignifikáns különbség a műtét után kialakult infekciók, szepszis, sokszervi elégtelenség, valamint veseelégtelenség számában a két csoport között. Az akut rejekeciók gyakorisága, valamint a szteroid lökéskezelésben részesült betegek száma szintén nem különbözött a csoportok között. A NODAT csoportban a retranszplantációk száma sem volt magasabb. A HCV pozitív betegekben szignifikánsan gyakrabban jelent meg de novo diabetes, mint HCV negatív betegekben, míg utóbbi betegekben a NODAT aránya 15,5% volt, addig minden második HCV pozitív betegnél (55,8%) de novo diabetes alakult ki. Más megközelítésben, a de novo diabeteses betegek 65%-a HCV pozitív volt, míg a kontroll csoportban csak a betegek 23%-a volt C vírussal fertőzött ($p < 0,001$) (5. táblázat). NODAT megjelenését követően emelkedett a HCV partikulumok mennyisége a szérumban. Míg a kontroll csoportban a HCV pozitív betegek ötödében lehetett megfigyelni a májátültetés előtti (baseline) HCV titerhez képesti 10x-es vírus kópiaszám emelkedést, addig de novo diabetes megjelenése után a betegek 53%-ban észleltük a vírus kifejezett replikációját ($p = 0,028$) (5. táblázat). Mindezekkel párhuzamosan a hepatitis C vírus kiújulás is hamarabb jelentkezett a de novo diabetes-es betegekben, egyúttal a de novo diabetes kialakulása előrejelzi a HCV rekurrenciát. Három hónapon belüli víruskiújulás csak de novo diabetes társulása mellett jelentkezett. Öt hónappal a májátültetés után a HCV rekurrenciában szenvedő betegek 80%-ban NODAT is fennállt (5. táblázat). A HCV rekurrencia idején vett biopsziákban mért HAI pontszámokban és a fibrosis score-ban nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között, ellenben a HCV kiújulás miatt alkalmazott egy éves antivirális kezelés befejezésekor szignifikánsan magasabb HAI és fibrosis score-t lehetett mérni a de novo diabetes mellitussal kezelt HCV pozitív betegekben, mint a nem cukorbeteg, szintén antivirális kezelésben részesült betegekben (5. táblázat). A de novo diabetes megjelenése esetén egyúttal csökken a beteg túlélés is. NODAT jelentkezése után az 1, 3 és 5 éves beteg túlélés 87%, 79%, 79%, míg a kontroll csoportban 95%, 91% és 88% volt ($p = 0,011$). Az 1,3 és 5 éves grafftúlélés a NODAT csoportban 87%, 79%, 79%, míg a kontroll csoportban 91%, 86%, 85% ($p = NS$) (8. ábra).

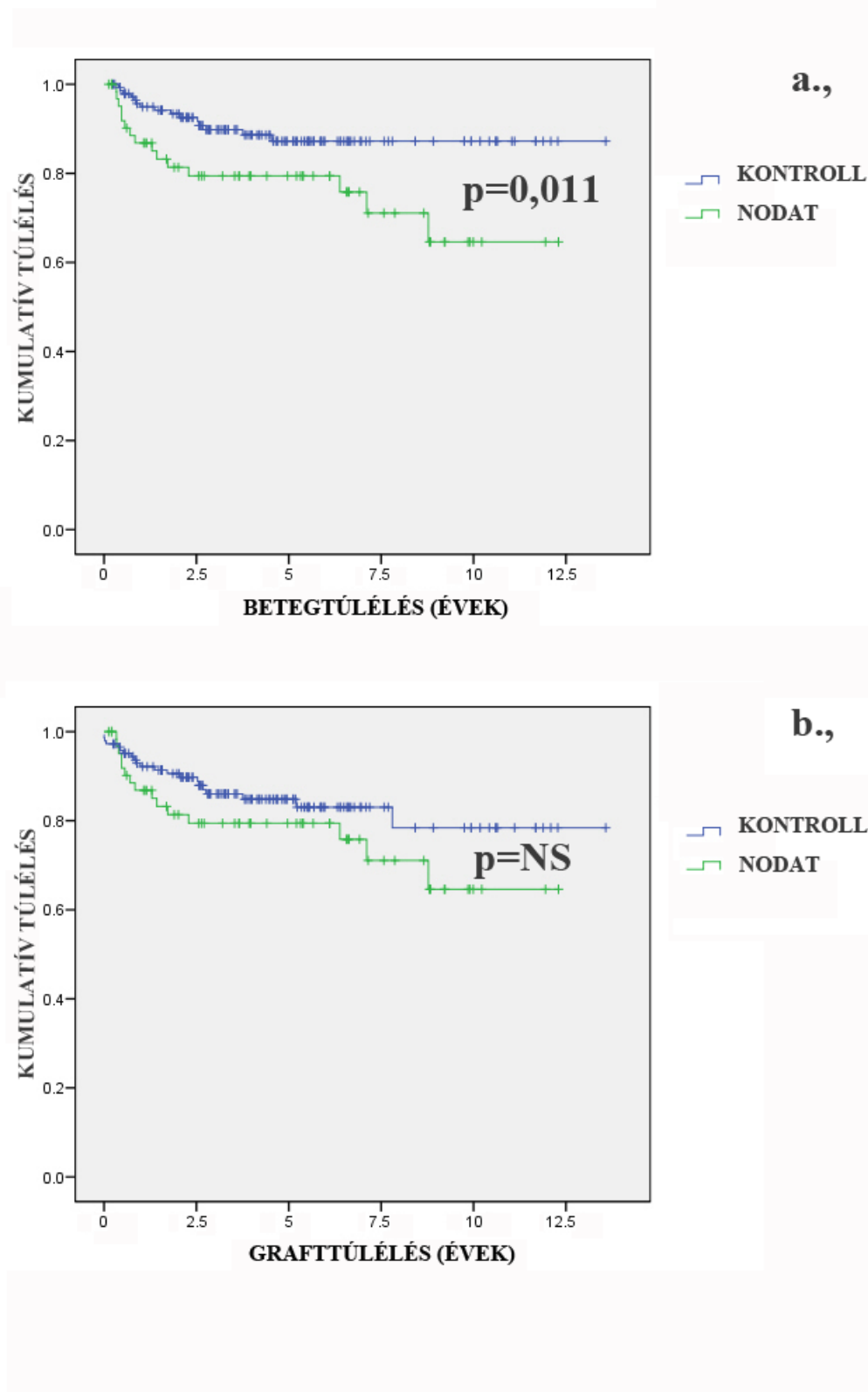
5. Táblázat- Donor és recipiens adatok a de novo diabetes és a kontroll csoportban.

A táblázat a folytonos változókat átlaggal és szórással, a kategorikusakat esetszámmal és a csoport egészéhez viszonyított százalékos arányával mutatja. Pre/PostOLT HCV-PCR >10x: a májátültetés előtti (baseline) HCV kópiaszám és a májátültetés utáni első 6 hónapban mért HCV titer között legalább 10x-es különbség áll fenn. 3 hónapon belüli HCV rekurrencia összesen 7 betegnél jelentkezett, míg 5 hónapon belüli 20 betegnél.

	De novo diabetes (N=63)	Kontroll (N=143)	p
Donor BMI (kg/m ²)	24,04 +/- 3,03	22,4 +/- 3,7	0,002
Donor nem (N=180)	33/24	41/82	0,002
Férfi/nő	(57,9%/42,1%)	(33,3%/66,7%)	
Recipiens életkor (év)	47,6 +/- 7,2	38,3 +/- 14,6	<0,001
Recipiens BMI (kg/m ²)	26,8 +/- 4	23,6 +/-5,3	<0,001
Recipiens nem (férfi/nő)	38/25 (60%/40%)	63/80 (44%/56%)	0,04
HCV pozitív betegek	43 (65%)	34 (23%)	<0,001
Pre/PostOLT	33 (53%)	29 (20%)	0,028
HCV-PCR >10x (10 ⁶ IU/mL)			
HCV rekurrencia			
3 hónapon belül (N=7)	7 (100%)	0 (0%)	0,019
5 hónapon belül (N=20)	16 (80%)	4 (20%)	0,017
HAI az 1 éves antivirális kezelés végén	3,25 +/- 2	1,69 +/- 1,2	0,019
Fibrosis score az 1 éves antivirális kezelés végén	2,05 +/- 1,5	1 +/- 1	0,039

8. ábra- Kumulatív beteg- (a.), és grafttúlélés (b.,) de novo diabetes mellitus esetén, valamint a kontroll csoportban (Kaplan-Meier ábrák).

NODAT: de novo diabetes mellitus (N=63). KONTROLL (N=143).



6.3. A hepatitis C vírus sejtbelépéséhez szükséges receptorok expressziójának változása HCV rekurrencia idején, valamint az egy éves antivirális kezelés után:

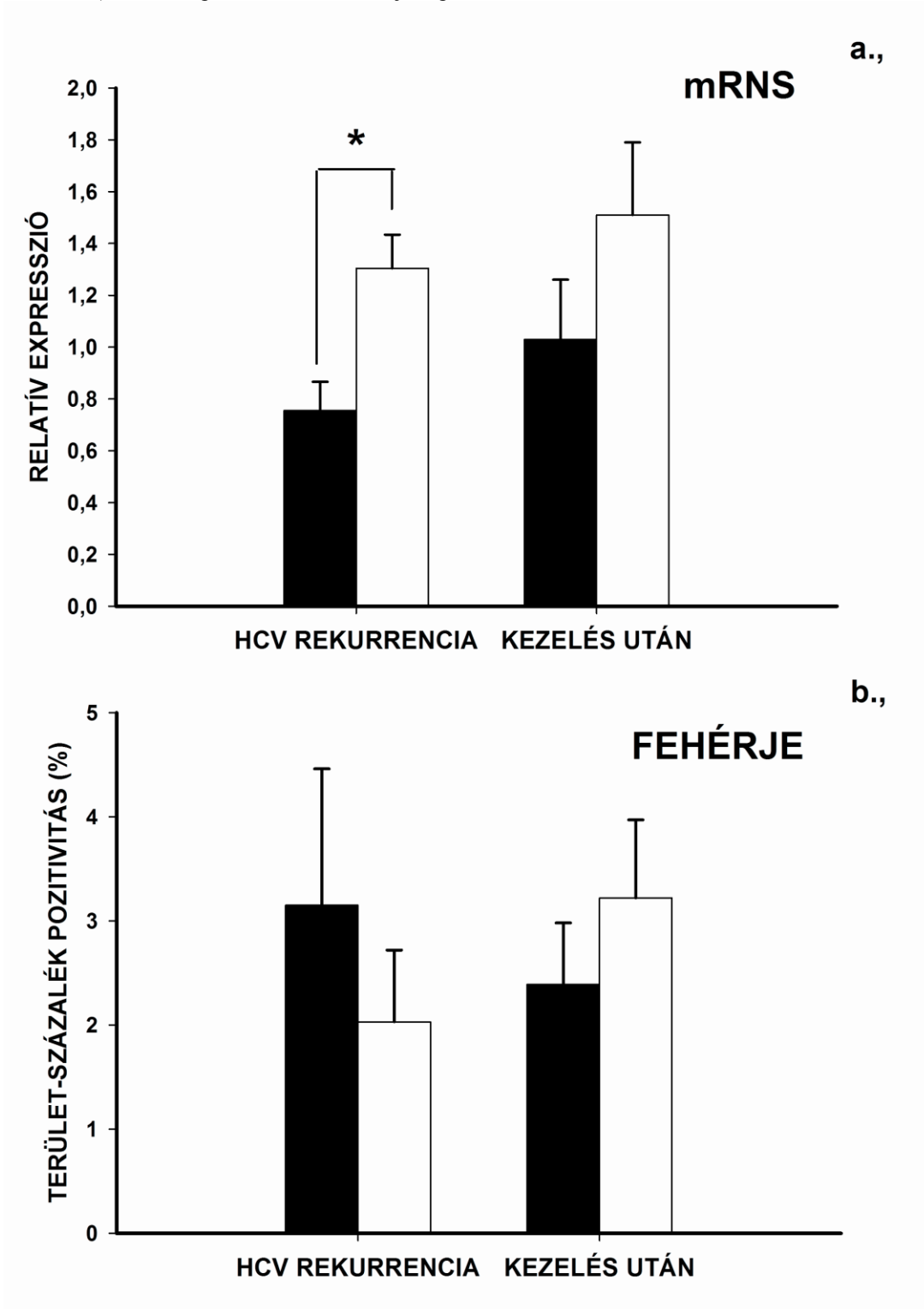
Vizsgálataink első fázisában a CLDN-1 expressziót vizsgáltuk 12 beteg májbiopsziás mintáiban, aszerint, hogy a beteg elérte-e a kezelés végére az end-of treatment response-t vagy sem. Első lépésben azért választottuk a kezelés végére elért vírusmentességet csoportosító szempontnak, mert a betegektől az IFN terápia befejezésekor vettek májbiopsziát, nem pedig 24 héttel később, amikor az SVR diagnózisához szükséges kontroll HCV kópia szám mérés megtörtént.

A HAI szignifikánsan csökkent mind a 12 betegben a kezelés végére (3,9 +/- 0,994 a rekurrencia idején és 2 +/- 1,83 a kezelés végén, $p < 0,001$). Ebben a 12 betegben úgy találtuk, hogy az ETR-t elérő betegek kezelés végén vett kontroll májbiopsziáiból meghatározott fibrosis score szignifikánsan alacsonyabb volt azon betegek májbiopsziás mintáihoz képest, akik vérből a kezelés végén ki lehetett mutatni polimeráz-lánreakcióval a HCV-t (0,8 +/- 0,837 az ETR és 2,75 +/- 0,957 a kezelés végén is HCV-PCR pozitív betegekben, $p = 0,018$).

Szignifikánsan alacsonyabb CLDN-1 mRNS expressziót mértünk a HCV rekurrencia idején vett biopsziákban azokban a betegekben, akik később vírusmentessé váltak a kezelés végére, mint azokban, akik nem (9. ábra). A kezelés végén ezt a különbséget már nem tapasztaltuk, és a fehérje expressziókban sem találtunk különbséget sem a kezelés előtt, sem utána (9. ábra).

9. ábra- CLDN-1 mRNS és fehérje expresszió májátültetés után, HCV rekurrencia idején és az egy éves antivirális kezelés befejezésekor.

A változók átlaga és az átlag szórása -standard error of mean (SEM)- van ábrázolva. Az mRNS szintek relatív expresszióban vannak feltüntetve, a fehérje expressziók az immunhisztokémia kvantitatív elemzéséhez használt Leica Qwin Pro 3.1 program által megadott terület-százalék pozitivitással. A * szimbolizálja a szignifikáns különbséget ($p < 0,05$). A fekete hasábok mutatják a kezelés végére vírusmentessé váló betegek CLDN-1 expresszióját (N=6), a fehér hasábok pedig a non-responderéket (N=6). (a.,) mRNS expressziók. (b.,) Fehérje expressziók.



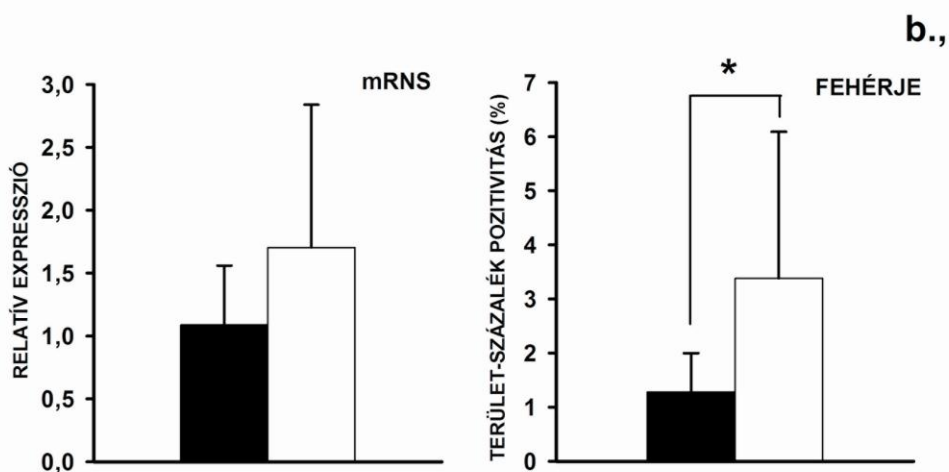
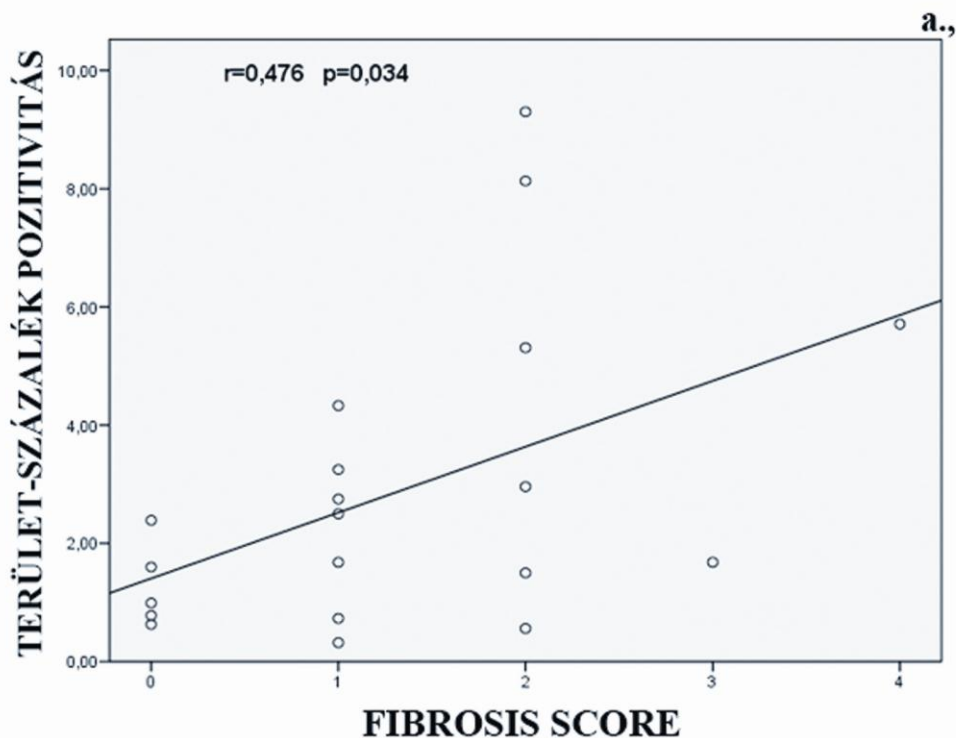
6.3.1. A CLDN-1 fehérje expresszió korrelál a fibrosis score-al:

Arra a kérdésre keresve a választ, hogy a HCV vírus titer, HAI index, vagy fibrosis score befolyásolja-e a CLDN-1 expressziót a májszövetben, korreláció elemzést végeztünk. Ezt a vizsgálatot a biopsziák csoportosítása nélkül végeztük (tehát nem csoportosítottuk őket aszerint, hogy mikor lettek véve és melyik betegből származtak, hanem közös „pool”-ban kezeltük őket). A korreláció elemzés során azt találtuk, hogy a HCV kópiaszám és HAI index nem befolyásolja érdemben a CLDN-1 fehérje expressziót, ellenben a máj fibrosis igen, méghozzá minél magasabb a fibrosis mértéke, annál magasabb a CLDN-1 expresszió is (10. ábra). A vizsgált 12 beteg májbiopsziáiból a diagnosztikum során meghatározott fibrosis score alacsony volt, a median értéket 1-nek találtuk. A biopsziákat aszerint csoportosítva, hogy a fibrosis score-ja median alattinak, vagy felettinek bizonyult, megvizsgáltuk, hogy találunk-e különbséget a két csoport között a CLDN-1 expresszióban. Ahogy a korreláció elemzés alapján vártuk is, azt találtuk, hogy amennyiben a fibrosis score 1 felett volt, a CLDN-1 fehérje expresszió is magasabb volt (10. ábra). A CLDN-1 expressziót igen kifejezettnek találtuk az epeutak hámsejtjeiben minden mintában (10. ábra). A hepatocyták plazmamembránjának mind a sinusoidalis (basolateralis), mind az apicalis (canicularis) felszínén ki lehetett mutatni festődést az immunhisztokémiai vizsgálat során, azonban a canicularis felszínen az immunreakció sokkal erősebb volt. Magasabb fibrosis score esetén az immunreakció is erősebbnek bizonyult (11. ábra).

10. ábra- CLDN-1 expresszió korrelációja a fibrosis score-al.

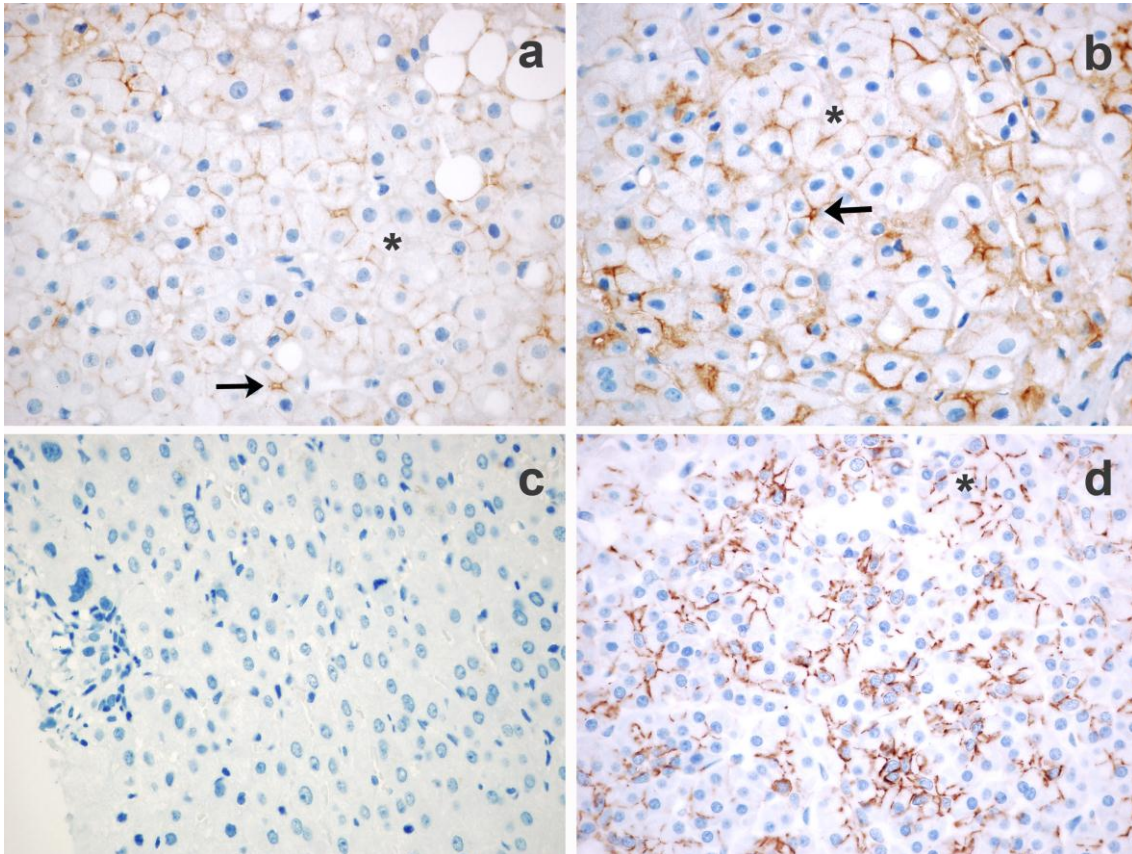
(a.,) Scatterplot („felhő diagram”), mely a CLDN-1 fehérje expresszió és fibrosis score közötti korrelációt ábrázolja. Az y tengely mutatja a függő változót, tehát a CLDN-1 expressziót, az immunhisztokémiai elemzés során kiszámolt terület-százalék pozitívításban. Az x tengelyen látható a független változó, a fibrosis score.

(b.,) CLDN-1 mRNS és fehérje expresszió aszerint, hogy a fibrosis score kisebb, vagy nagyobb, mint 1. A változók átlaga és az átlag szórása -standard error of mean (SEM)- van ábrázolva. Az mRNS szintek relatív expresszióban vannak feltüntetve, a fehérje expressziók az immunhisztokémia kvantitatív elemzéséhez használt Leica Qwin Pro 3.1 program által megadott terület-százalék pozitívítással. A * szimbolizálja a szignifikáns különbséget ($p < 0,05$). A fekete hasábok esetén a fibrosis score < 1 , a fehér hasábok esetén > 1 .



11. ábra- Immunhisztokémiai képek, melyek a CLDN-1 expressziót mutatják enyhe és súlyos májfibrosis esetén.

A nyilak a májsejtek canalicularis, a csillagok a sinusoidalis felszínét mutatják. A nagyítás mértéke x60. (a.,) Fibrosis score 1. (b.,) Fibrosis score 4. (c.,) negatív kontroll (májbiopszia, melyben az elsődleges antitest kihagyásával történt immunreakció). (d.,) pozitív kontroll (human hepatocellularis cc. minta, mely ismertén magasan expresszálja a CLDN-1-et).



Vizsgálatunk második részében kibővítettük a betegek körét, összesen 28 beteget vizsgáltunk, egyúttal változtattunk a csoportosításon, végpontnak ezúttal nem a kontroll biopszia idején igazolt vírusmentességet, hanem a terápia sikerességét igazoló SVR-t tekintettünk, két csoportunk így az SVR és non-responder volt. Ezenfelül vizsgáltuk a HCV receptor expressziókat beültetésre került donormájokban is.

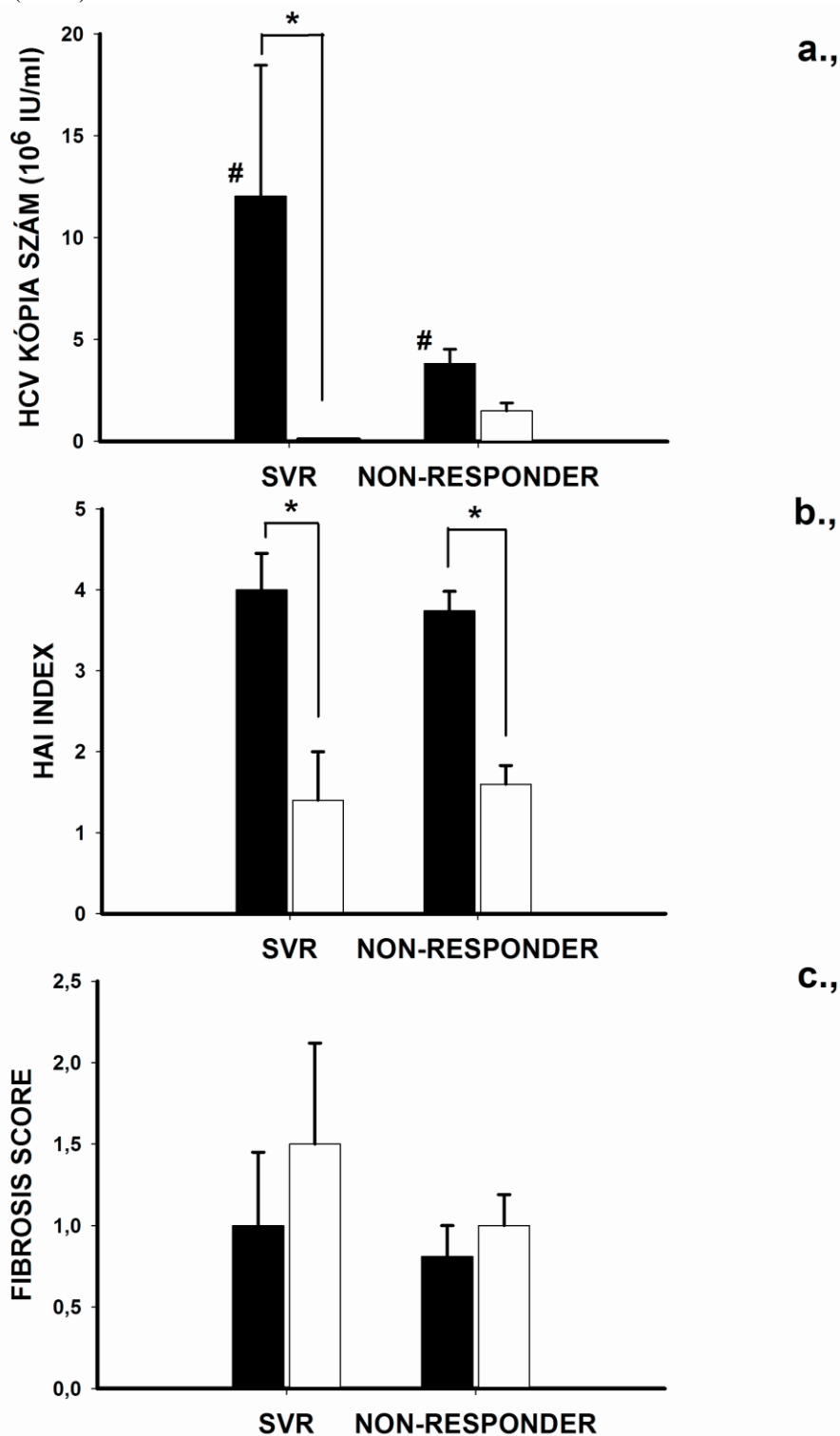
6.3.2. A betegek klinikai paraméterei a HCV rekurrencia idején és a kezelés befejezésekor:

Érdekes módon azokban a betegekben, akik később elérték a tartós vírusmentességet, a kezelés kezdetekor magasabb HCV kópiaszámról indultak, mint azok, akik a kezelés során non-responderek voltak (12. ábra). Az SVR-es betegekben definíció szerint a kezelés végén nem lehetett vírust izolálni a szérumból. A non-responderekben is csökkent a HCV kópiaszám az antivirális kezelés hatására, de a csökkenés mértéke nem volt szignifikáns (12. ábra). A hepatitis súlyosságát jelző HAI score mind az SVR-es betegekben, mind a non-responderekben szignifikánsan csökkent a kezelés végére (12. ábra). Nem találtunk különbséget a fibrosis mértékében a kezelés végén az SVR-es és non-responder betegek között, szintúgy nem volt különbség a rekurrencia idején mért fibrosis mértéke és a kezelés utáni kötőszövetes átépülés súlyossága között egyik betegcsoportban sem (12. ábra).

A szérum AST és ALT szintek szignifikánsan csökkentek a kezelés végére a tartós vírusmentességet elért betegekben ($p=0,06$ és $<0,001$), érdekes módon az obstrukciós enzimek (ALP, GGT) csak a non-responderekben csökkentek szignifikánsan ($p<0,001$ és $p=0,046$) (13. ábra).

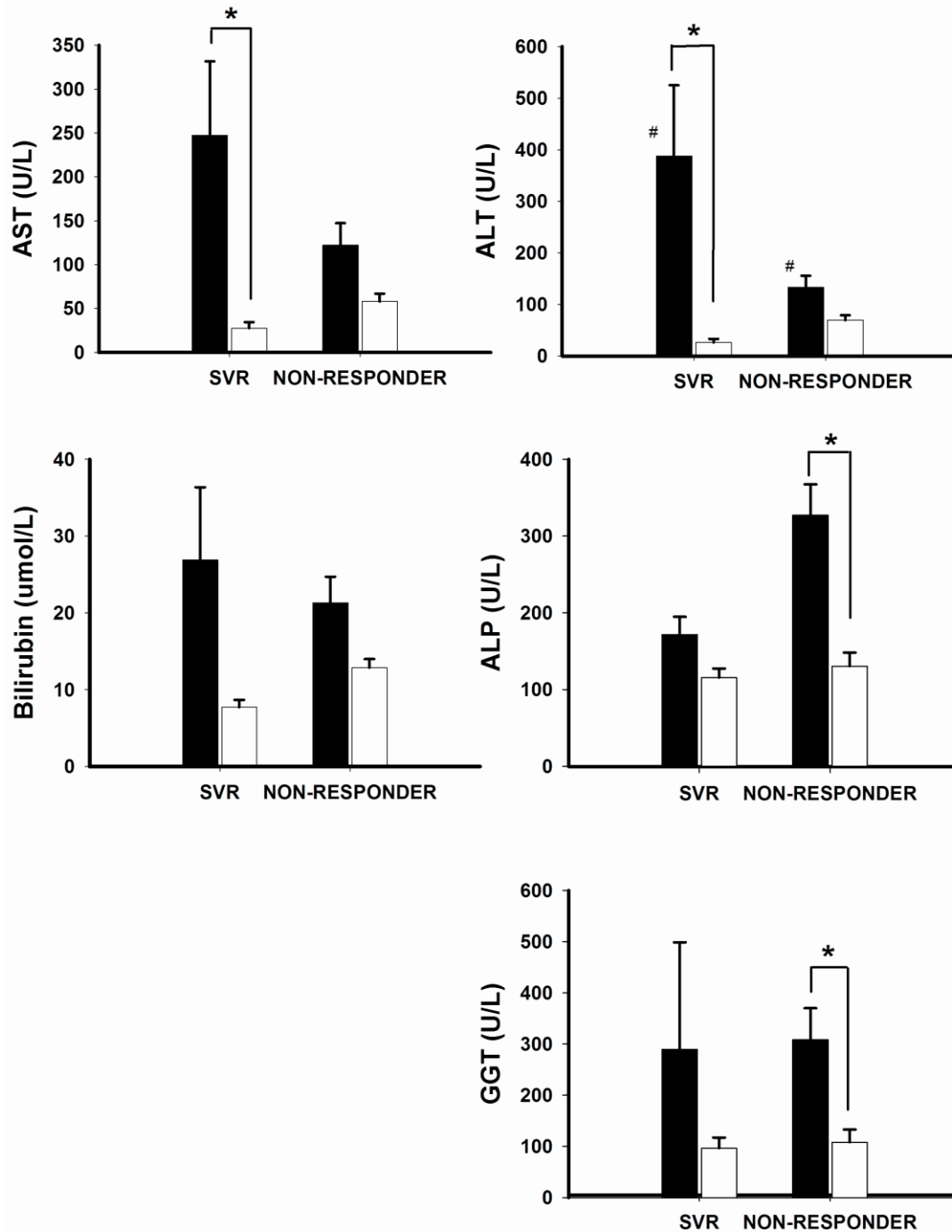
12. ábra- A vizsgálatban szereplő májátültetett betegek szérumból izolált HCV kópiaszám, valamint a májbiopsziák HAI és fibrosis score-ja.

A változók átlaga és az átlag szórása -standard error of mean (SEM)- van ábrázolva. A * és # szimbolizálják a szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$). (a.) HCV kópiaszám (RT-PCR-al mérve, 10^6 IU/ml). (b.) HAI index. (c.) Fibrosis score. A fekete hasábok mutatják a kezelés előtti, a fehérek a kezelés utáni értékeket, mind a tartós vírusmentességet elért betegekben (SVR, N=6), mind a non-responderekben (N=22).



13. ábra- Májátültetett betegek laborvizsgálat során mért májenzimek az antivirális kezelés előtt és után.

A változók átlaga és az átlag szórása -standard error of mean (SEM)- van ábrázolva. A * és # szimbolizálják a szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$). A fekete hasábok mutatják a kezelés előtti, a fehérek a kezelés utáni értékeket, mind a tartós vírusmentességet elért betegekben (SVR, N=6), mind a non-responderekben (N=22).



6.3.3. CLDN-1, CLDN-6, CD81 és occludin expressziók a beültetésre került donormájokban és a májátültetést követő HCV kiújulás idején vett májbiopsziákban:

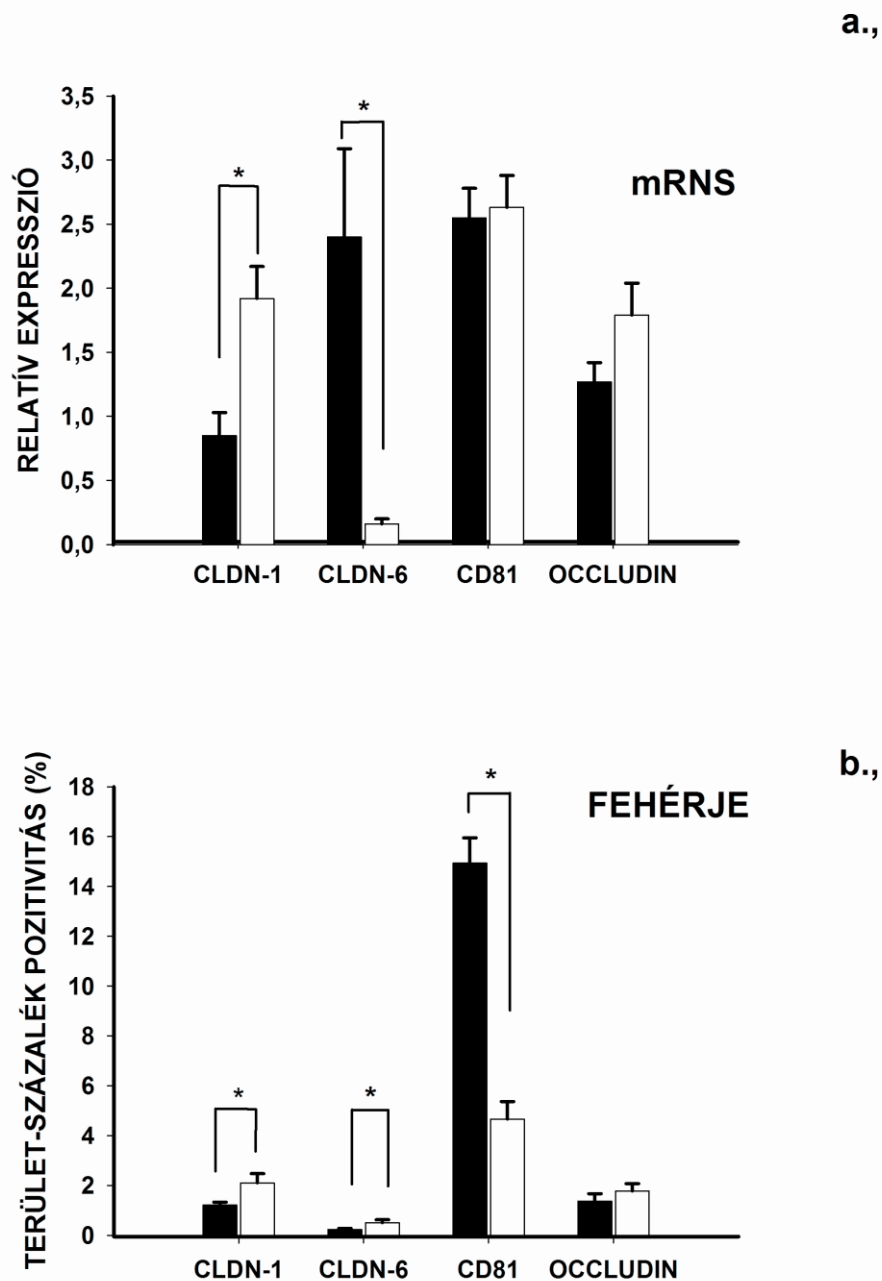
Megvizsgáltuk, hogy a HCV rekurrencia idején változnak-e a HCV receptor expressziók a donormájokban mért szintekhez képest. A májbiopsziákat ebben az összehasonlításban nem csoportosítottuk aszerint, hogy később a beteg hogyan reagált az antivirális kezelésre.

A CLDN-1 és CLDN-6 fehérje szinteket magasabbnak találtuk HCV rekurrencia idején a donormájokban mért szintekhez képest, ellenben a HCV kiújulása csökkent CD81 fehérje expresszióval társult (14., 15. ábrák, $p=0,034$; $0,039$ és $<0,001$). A CLDN-1 mRNS expresszió a fehérjéhez hasonlóan magasabb volt HCV rekurrencia esetén a beültetett egészséges májokban észlelthez képest (14. ábra). A CLDN-6 és CD81 mRNS expressziói ellenben nem változtak egyirányban a fehérje szintekkel úgy, mint ahogy azt a CLDN-1 esetén láttuk. A CLDN-6 mRNS expresszió (szemben a fehérjével) csökkent a HCV kiújulás idejére, míg a CD81 mRNS expresszió nem változott érdemben a donormájokban mért értékekhez képest (14. ábra). Az occludin mRNS és fehérje expressziói nem különböztek érdemben a HCV okozta hepatitis ismételt megjelenésekor a beültetett májokban mért értékektől (14. ábra).

A CLDN-6 és occludin expresszió, csakúgy mint a CLDN-1, döntően a májsejtek apicalis felszínén volt látható, azonban kismértékű sinusoidalis pozitivitást a CLDN-6 és occludin esetén is lehetett látni. A CD81 expresszió ellenben döntően a májsejtek sinusoidalis felszínén volt látható, az apicalis felszínen csak minimális festődés volt megfigyelhető. Az epeutak hámszövetjének luminalis felszínén nem csak a CLDN-1, de az occludin is nagyon erősen festődött, a CLDN-6 mérsékelten, míg a CD81 egyáltalán nem expresszálódott az epeutakban (15. ábra).

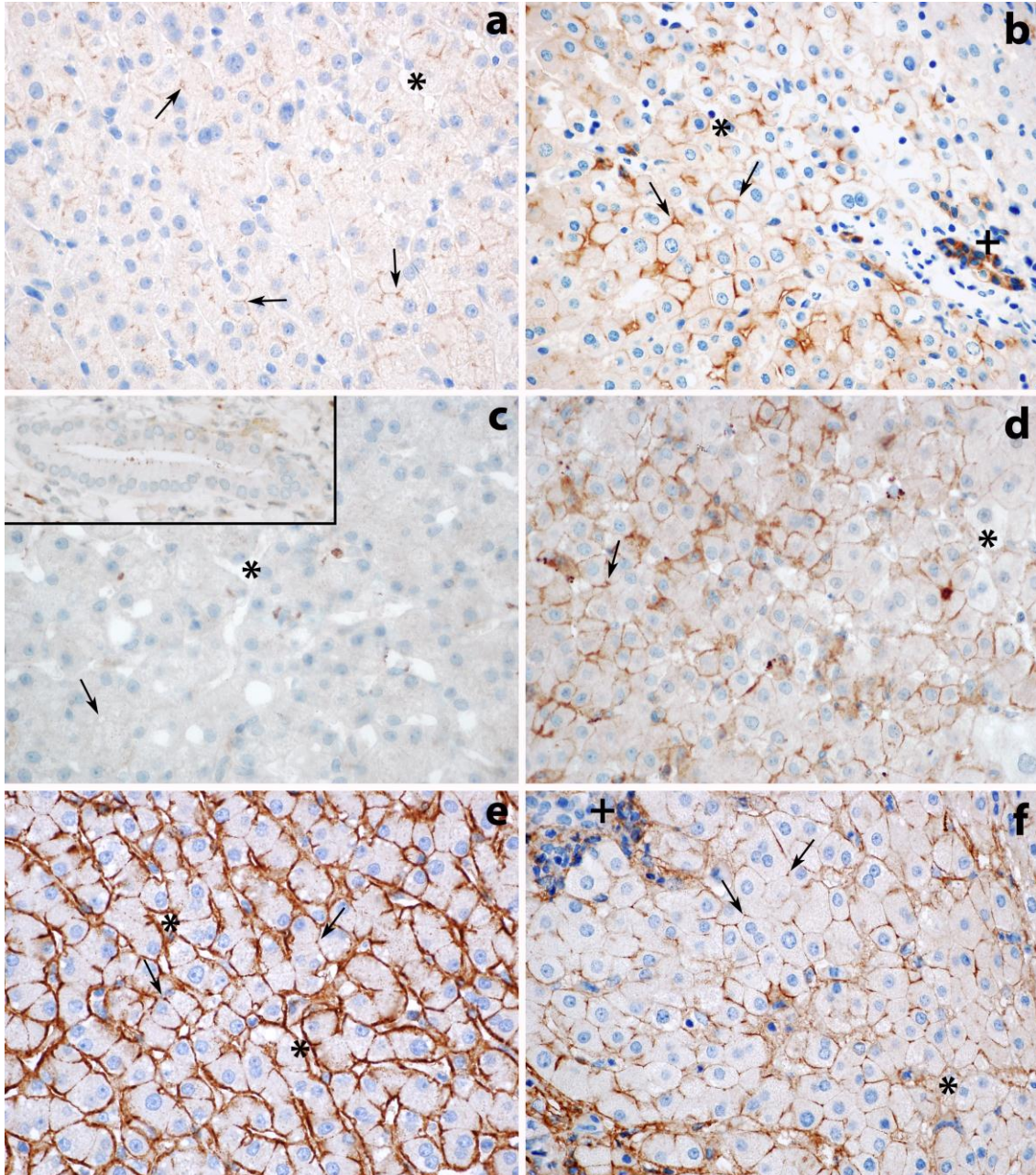
14. ábra- CLDN-1, CLDN-6, CD81 és occludin mRNS és fehérje expressziók normál (donor) májakban, illetve HCV rekurrencia idején vett májbiopsziákban.

A változók átlaga és az átlag szórása -standard error of mean (SEM)- van ábrázolva. Az mRNS szintek relatív expresszióban vannak feltüntetve, a fehérje expressziók az immunhisztokémia kvantitatív elemzéséhez használt Leica Qwin Pro 3.1 program által megadott terület-százalék pozitivitással. A * szimbolizálja a szignifikáns különbséget ($p < 0,05$). A fekete hasábok a donormájokban mért receptor expressziókat (N=13), a fehér hasábok a HCV rekurrencia idején vett májbiopsziákban mért receptor szinteket (N=28) mutatják.



15. ábra- Immunhisztokémiai képek, melyek a CLDN-1, CLDN-6 és CD81 expressziót mutatják donor (normál) májakban és HCV rekurrencia idején vett májbiopsziákban.

A nyilak a májsejtek canalicularis, a csillagok a sinusoidalis felszínét mutatják, a kereszt pedig egy epeutat. A nagyítás mértéke x60. CLDN-1 fehérje expresszió normál májakban (a.) és HCV rekurrencia idején vett biopsziákban (b.). CLDN-6 fehérje expresszió normál májakban (c.) és HCV rekurrencia idején vett biopsziákban (d.). CD81 fehérje expresszió normál májakban (e.) és HCV rekurrencia idején vett biopsziákban (f.). A (c.) képen lévő inzerit a CLDN-6 pozitivitást mutatja az epeúti hámsejtek luminalis felszínén.



6.3.4. HCV receptor expressziók IFN-ribavirin kezelés előtt és után:

A CLDN-6 fehérje expressziót magasabbnak találtuk a HCV rekurrencia idején azokban a betegekben, akik később elérték a tartós vírusmentességet, mint azokban, akik non-responderek voltak (16. ábra, $p=0,006$). A CLDN-6 fehérje expresszió azonban szignifikánsan csökken a kezelés befejezésére az SVR-t elérő betegekben ($p=0,01$), szemben a non-responderekkel, akikben érdemi változást nem váltott ki az IFN kezelés (16., 17. ábra). Az IFN kezelés végén vett májbiopsziákban a CLDN-6 expresszió nem változott szignifikánsan a donormájokban mért értékekhez képest, egyik betegcsoportban sem.

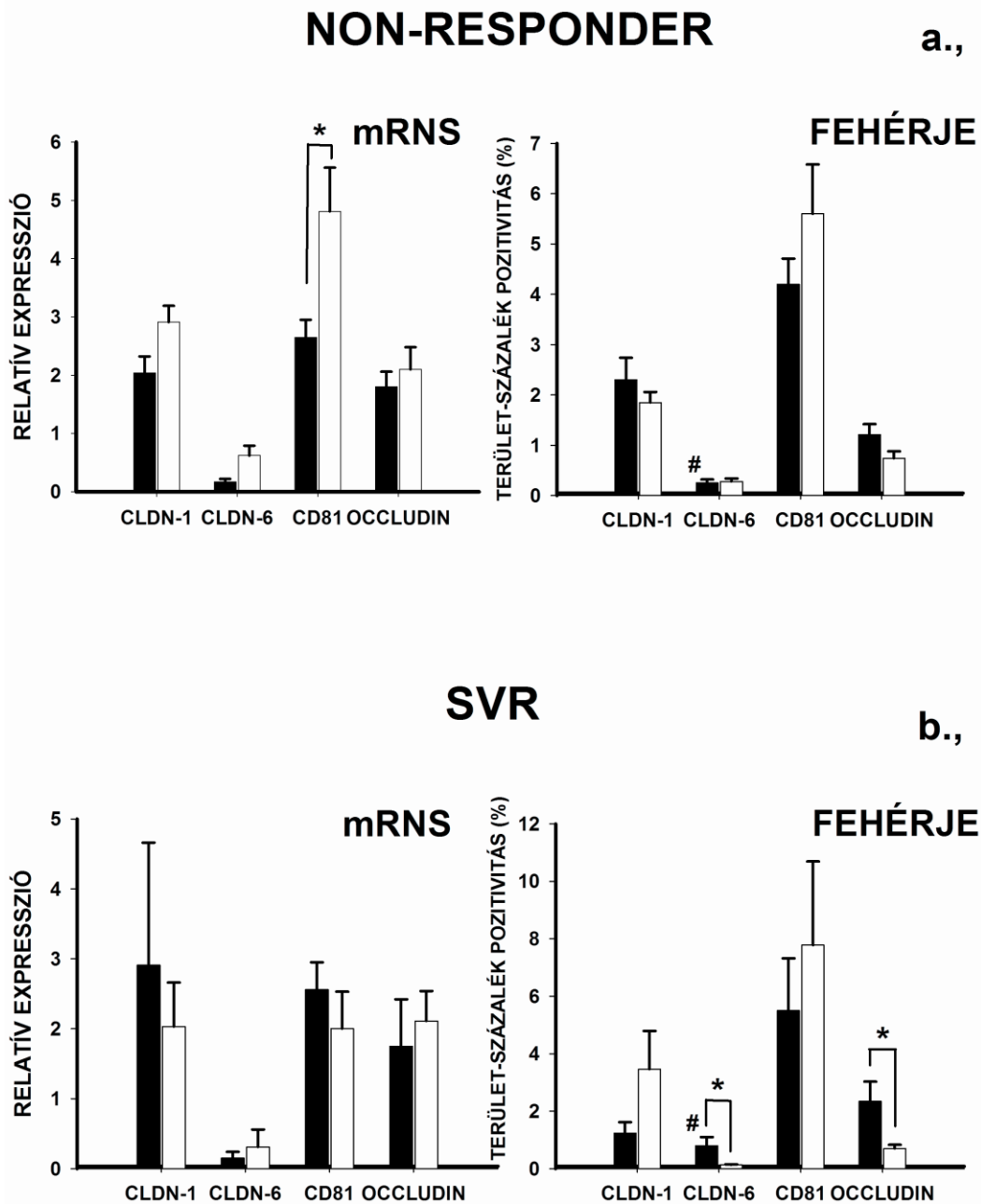
Az occludin fehérje szint szignifikánsan csökkent a kezelés végére a tartós vírusmentességet elérő betegekben a kezelés kezdetkor mérthez képest ($p=0,027$), a non-responderekben az expresszió nem változott szignifikánsan a kezelés hatására (16., 17. ábrák). A kezelés végén vett biopsziákban és a donormájokban mért occludin expresszió között szintén nem találtunk szignifikáns különbséget.

A CD81 és CLDN-1 fehérje expressziók nem változtak az IFN kezelés hatására (16. ábra). A CD81 expresszió a kezelés végén is alacsonyabb volt a májátültetett betegekben a donormájokban mérthez képest (külön nincs ábrázolva, $p<0,001$). A HCV receptorok mRNS szintjeit szintén nem befolyásolta az IFN kezelés, egyedül a CD81 mRNS expresszió esetén lehetett változást kimutatni a kezelés hatására, azonban csak a non-responderekben (17. ábra). Ezekben a betegekben a kezelés végén magasabb volt a CD81 mRNS expresszió, mint a rekurrencia idején.

Az SVR-es betegekben a CLDN-6 fehérje expresszió erősen korrelált a HCV kópiaszámmal ($r=0,962$; $p=0,009$), a non-responderekben ilyen összefüggést nem találtunk. Az occludin fehérje expresszió korrelált a HAI index-szel ($r=0,340$; $p=0,028$), függetlenül attól, hogy a beteg elérte-e a tartós vírusmentességet, vagy sem. A CLDN-6, CD81 és occludin expressziók nem korreláltak a fibrosis score-al.

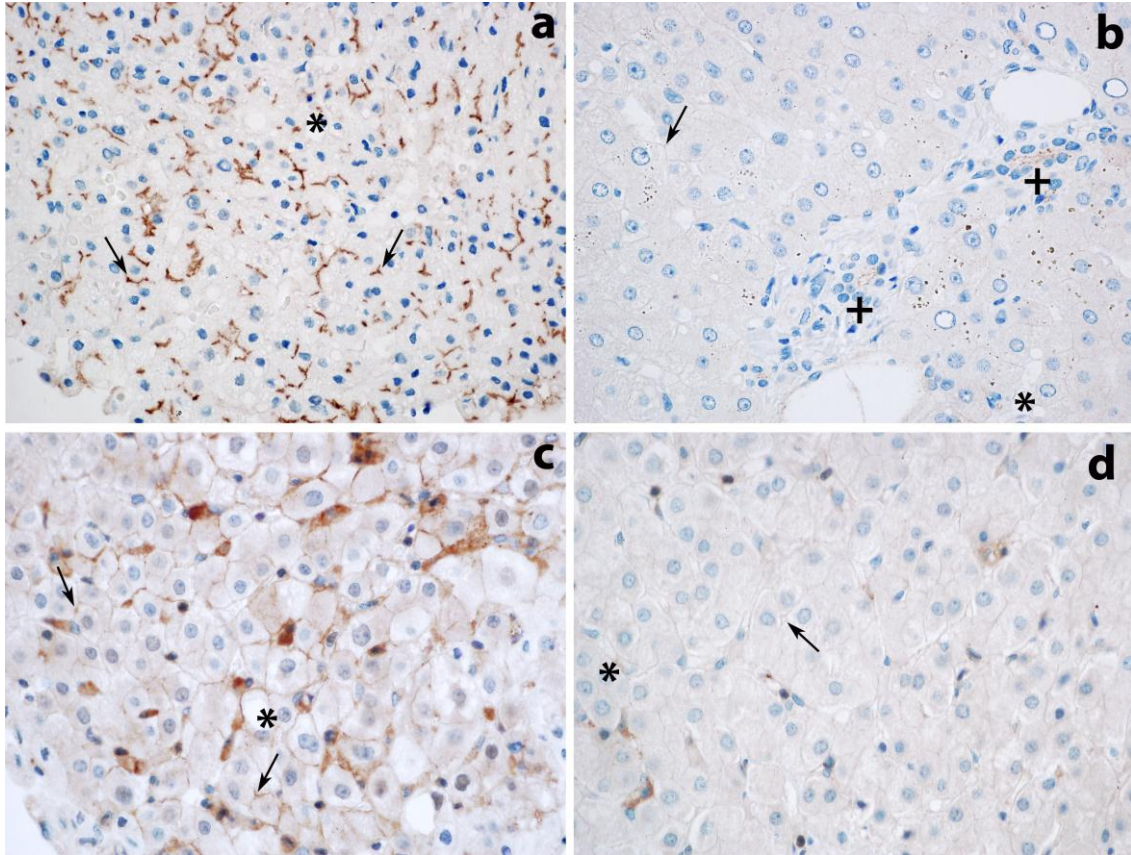
16. ábra- CLDN-1, CLDN-6, CD81 és occludin mRNS és fehérje expressziók májátültetett betegekben, IFN-ribavirin kezelés előtt és után.

A változók átlaga és az átlag szórása -standard error of mean (SEM)- van ábrázolva. Az mRNS szintek relatív expresszióban vannak feltüntetve, a fehérje expressziók az immunhisztokémia kvantitatív elemzéséhez használt Leica Qwin Pro 3.1 program által megadott terület-százalék pozitivitással. A * és # szimbolizálják a szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$). A fekete hasabok mutatják a kezelés előtti, a fehérek a kezelés utáni értékeket, mind a non-responderekben (a.) (N=22), mind a tartós vírusmentességet elért betegekben (b.) (SVR, N=6).



17. ábra- Immunhisztokémiai képek, melyek az occludin és CLDN-6 expressziót mutatják májátültetett betegekben az antivirális kezelés előtt és után.

A nyilak a májsejtek canalicularis, a csillagok a sinusoidalis felszínét mutatják, a keresztek pedig az epeutakat. A nagyítás mértéke x60. Occludin fehérje expresszió kezelés előtt (a.) és után vett biopsziákban (b.). CLDN-6 fehérje expresszió kezelés előtt (c.) és után vett biopsziákban (d.).



7. Megbeszélés

Kutatásunk során három aspektusból vizsgáltuk meg a májátültetés utáni HCV kiújulás progresszióját. Két klinikai szempont alapján (donor-recipient párosítás szerepe, valamint a de novo diabetes és HCV közötti kapcsolat vizsgálata a magyar májátültetett beteganyagban), valamint a HCV sejtbelépéséhez szükséges vírusreceptorok molekulárbiológiai vizsgálatával.

A donor-recipient párosítás májátültetés utáni eredményekre gyakorolt szerepének vizsgálata során első lépésben megvizsgáltuk, hogy a donor-recipient párosításnak van-e hatása a műtét utáni eredményekre. Mint azt már az általános megfontolások fejezetben felvázoltam, az általános donor hiány arra ösztönzi a transzplantációs centrumokat, hogy liberálisabban kezeljék a donor szelekciós kritériumokat, és olyan májakat is beültessenek, melyek magukban hordják a PNF és IPF potenciális veszélyét. Ezeket a májakat hívjuk ECD, vagy marginális májnak. Általánosságban az alábbi paramétereket veszik alapul a marginalitás megállapítására (a kritériumok nagy szórása miatt nem írok konkrét értékeket, csak azokat a faktorokat, melyeket vizsgálnak): életkor, BMI, máj necroenzimek, bilirubin, hypernatraemia, donor vírusserológiai státusza, szívmegeállást követő donáció (donation after cardiac death, korábban non-heart beating donornak nevezték), hideg ischaemiás idő (CIT) hossza, intenzív osztályon töltött napok száma, keringéstámogató szerek dozírozása, májtrauma ((266), összefoglalva (82)). A Magyarországon alkalmazott donor szelekciós kritérium rendszer igen szigorúnak számít világviszonylatban, az általunk alkalmazott marginális kritériumok (lsd. 2. táblázat) többsége számos centrumban még az optimális kategóriába tartozna. Pl. 27 kg/m² feletti BMI-vel rendelkező donort mi ECD kritériumnak tekintettünk, ugyanakkor Tector és munkatársai 34,9 kg/m² BMI felett tekintettek egy donort marginálisnak. Pont emiatt, vizsgálatunk során nem az irodalomban jól bevált gyakorlatot folytattuk a donorok csoportosításánál, miszerint már egy kritérium teljesülése esetén is marginálisnak tekintünk egy donort, hanem legalább kettő kritérium egyidejű teljesülése után mondtuk ki a marginalitás tényét. A betegek MELD score szerinti csoportosításakor Vitale és munkacsoportja 2007-ben történt vizsgálatát vettük alapul, akik azt találták, hogy marginális máj beültetése esetén a magas MELD score a

betegtúlélést hátrányosan befolyásoló tényező volt (267). Sikertelt egy cutoff értéket meghatározniuk, mely feletti MELD esetén jelentősen alacsonyabb volt a betegtúlélés ECD máj beültetése után, és ez 17 volt.

Az alapján, hogy egy májrecipiens optimális, vagy ECD májat kapott, valamint hogy a recipiens MELD pontszáma meghaladta-e a 17-et, négy csoportot alkottunk (G/G, G/B, B/G, B/B), és ezeket összehasonlítottuk aszerint, hogy a posztoperatív szövődmények aránya, valamint a betegtúlélés változik-e a különböző csoportok között. Ilyen jellegű csoportosítás alapján végezte korábbi vizsgálatait Avolio és munkacsoportja, akik először az UNOS státusz (United Network for Organ Sharing) alapján határozták meg a recipiens általános állapotát (268), majd ugyanez a csoport később MELD alapján csoportosította a betegeket. Utóbbi vizsgálatuk során 3 recipiens csoportot különítettek el, és találtak is különbséget a grafftúlélésben az alacsony és magas MELD score-al bíró betegek között, még hozzá magas rizikójú beteg ECD májjal történt transzplantációja után a betegtúlélés alacsonyabb volt. Következtetésük az volt, hogy a transzplantáció pillanatában magas MELD score-al rendelkező betegek lehetőleg ne kapjanak marginalis májat. Ez ellentmond részlegesen Silberhumer és munkatársai eredményeinek, akik csak progrediáló MELD esetén találták azt, hogy rosszabbodna a túlélés ECD máj beültetése esetén (269). Ők a MELD score változása alapján csoportosították a betegeket (a listára helyezéshez képest emelkedik-e a MELD pontszám a transzplantációig, vagy sem). Vizsgálatuk során azt találták, hogy amennyiben több marginalis kritériummal rendelkező donormájat ültettek be egy fokozatosan progrediáló májfunkciójú (a transzplantációs listára helyezéshez képest tovább emelkedett a MELD score a májátültetésig) recipiensnek, úgy magasabb volt a mortalitás és a PNF/IPF gyakorisága azokhoz a szintén magas MELD score-al rendelkező betegekhez képest, akik optimális grafftot kaptak (269). A szerzők hangsúlyozzák, hogy a beteg állapotának változása a kulcsfontosságú, ugyanis míg folyamatosan progrediáló májfunkció mellett marginalis máj beültetése jelentősen rontja a transzplantáció utáni eredményeket, addig egy stabil MELD score-al (legyen az bármilyen magas is) rendelkező beteg életkilátásait nem befolyásolja a beültetett májgraft „minősége”, tehát ECD donorok alkalmazásával is elfogadható műtét utáni eredményeket lehet elérni. Ebből a gondolatmenetből vonták le azt a következtetést is, hogy érdemes primer májrák miatt májvárólistán lévő betegekbe ECD donorokból

származó májat transzplantálni, két okból is. Egyrészt a tumor progressziójának megelőzése miatt szükséges, hogy minél rövidebb ideig várjanak az életmentő májra, másrészt, mivel stabil májfunkcióval rendelkeznek, biztonsággal kaphatnak marginális graftot is. Megjegyzendő, hogy Avolio és munkacsoportja más utánkövetési időben vizsgálta a betegeket, mint Silberhumer és társai, valamint Avolio és munkatársai csak a listára helyezéskor számított MELD-et használták a vizsgálatuk során.

További ok, amiért fontos a marginális májak használata, az az, hogy így jelentősen csökkenthető a várólistán töltött idő hossza (266). Amin és csoportja közölte, hogy magasabb kockázatot jelent 20 fölötti MELD esetén a beteg listán tartása, mintha ECD májjal gyorsan májátültetésben részesítenénk (270), így ugyanis még mindig alacsonyabb a várható mortalitás, mintha a beteg várakozna egy optimális májra.

Saját anyagunkban marginális máj beültetése, valamint magasabb rizikójú beteg transzplantációja után csökkent betegtúlélést észleltünk egy évvel a transzplantáció után (6. ábra), azonban a hosszú távú betegtúlélés már nem különbözött szignifikánsan a csoportok között. A magasabb egy éven belüli mortalitás a gyakrabban fellépő közvetlen posztoperatív szövődményeknek volt köszönhető, ugyanis marginális máj átültetése után (különösen, ha a beteg a magas rizikójú csoportba tartozott), gyakrabban jelentkezett a májátültetés után IPF, hasúri vérzés, valamint veseelégtelenség. A G/G csoporthoz képest a szövődmények tekintetében elsősorban a B/B csoport különbözött szignifikánsan, ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy marginális máj beültetése elsősorban a rossz állapotú betegek esetében jár fokozott kockázattal, egy relatíve jó általános állapotú, tartalékokkal rendelkező beteg képes kompenzálni a szuboptimális máj beültetésével társuló esetleges hátrányokat. Eredményeink összhangban állnak az Avolio és Silberhumer által közöltekkkel, miszerint a megfelelő donor-recipiens párosítás elengedhetetlen az elfogadható műtét utáni eredmények eléréséhez.

Kutatásunk során nem találtunk különbséget a májátültetés utáni HCV titerben, valamint a HCV rekurrencia súlyosságában és a kiújulás idejében a vizsgált csoportok között. Megjegyzendő azonban, hogy ennek oka lehet a B/B csoport kis esetszáma (N=37), valamint az, hogy az általunk alkalmazott marginális kritériumok a nemzetközi viszonylatban igen enyhék. Az irodalmi adatok alapján HCV pozitív beteg kaphat ECD donorból májat primer OLT során, illetve retranszplantáció alkalmával is. Mint már arról korábban is említést tettem, a donor életkora, valamint a donormáj

macrovesicularis steatosisa független rizikófaktorai a HCV rekurrenciának és a magasabb mortalitásnak. Az emelkedett meleg és hideg ischaemiás idők egyaránt hajlamosítanak a súlyosabb HCV kiújulásra és rontják a túlélést is (94;147). A hosszabb ischaemiás idők egyúttal növelik az epeúti szövődmények gyakoriságát is, melyek szintén súlyosbíthatják a rekurrenciát egyes közlések szerint (összefoglalva (82)). A szív megállást követően történő szervkivétel során sok esetben magasabb a meleg ischaemiás idő, többek között ennek tulajdonítják a számos közleményben leírt magasabb recipiens mortalitást és az epeúti szövődmények nagyobb arányát (összefoglalva (271)). Egy tanulmány szerint a HCV pozitív betegek 5 éves kumulatív túlélése szignifikánsan rosszabb volt non-heart beating donorból származó máj átültetését követően, mint agyhalott cadaver donorból eltávolított máj beültetése után (272). A HCV pozitív donorokból származó graftok biztonsággal ültethetőek be HCV pozitív recipiensekbe, mind a fibrosis progressio mértéke, mind a beteg túlélése azonos a HCV negatív donorokból eltávolított májak beültetése után észleltekkel (273). Khapra és munkatársai eredményei ezt alátámasztják, azonban hangsúlyozzák, hogy a HCV pozitív donor fiatal legyen, ugyanis vizsgálatuk során azt találták, hogy amennyiben egy HCV pozitív donor 50 évnél idősebb volt, úgy ebben az esetben magasabb volt a graftvesztés aránya és a betegek halálózása, mint hasonló korú, de HCV negatív donorból származó máj átültetését követően (274). A magyar májátültetési programban nem gyakorlat a HCV pozitív donorokból történő szervkivétel, pedig az irodalmi adatok alapján jó állapotú, relatíve stabil májfunkciójú beteg transzplantációja HCV pozitív májjal nem rejt magában plusz kockázatot a HCV negatív máj beültetéséhez képest.

A hepatitis C vírus és a májátültetés után fellépő de novo diabetes mellitus közötti összefüggés vizsgálata során először definiálnunk kellett a de novo diabetest. Igen nagy különbségeket lehet találni az irodalomban aszerint, hogy hogyan definiálják és milyen időintervallumban vizsgálják a májátültetés után megjelenő cukorbetegséget. A NODAT diagnózisát egyes tanulmányokban a rutin laborvizsgálat alapján igazolt cukorbetegség (emelkedett éhomi vércukor mérésével és/vagy orális glükóz tolerancia teszttel történő igazolás révén) esetén állítják fel, míg más tanulmányok az antidiabetikus kezelés megkezdéséhez kötik a NODAT definícióját (275-277). Egy nagy esetszámú kohort tanulmányban (Khalili és munkatársai) de novo diabetest abban az

esetben állapították meg, amennyiben a beteg antidiabetikus kezelésben részesült (88). Két típusát különböztették meg, a tranziens és perzisztens formát. A két típust a szénhidrát háztartás felborulásának megjelenési ideje és fennállásának hossza alapján különböztették meg. A posztoperatív időszakot az alábbi időszakokra osztották fel: 0-2 hét, 2-6 hét, 6 hét- 4 hónap, 4 hónaptól 1 év, majd pedig minden műtét utáni év egy intervallum egészen az 5. posztoperatív évig, így összesen 8 vizsgálati időintervallumot különítettek el. Tranziensnek tekintették a diabetest, amennyiben kettőnél kevesebb vizsgált időintervallumban lehetett csak megfigyelni a cukorbetegséget, míg perzisztensnek akkor, amennyiben háromnál több időszakban állt fenn, ebből az egyiknek pedig az első 4 posztoperatív hónapon belül kellett lennie. A betegek 37,7%-ban figyelték meg a cukorbetegség kialakulását a transzplantáció után, azonban az esetek döntő többségében a cukorbetegség a tranziens csoportba tartozott, tehát rövid idő múltán megszűnt a szénhidrát háztartás zavara. Ebben a tanulmányban a HCV infekció független rizikófaktora volt a perzisztens diabetes kialakulásának. Míg ebben a tanulmányban a de novo diabetes diagnózisához alapfeltételnek tekintették, hogy az az első posztoperatív éven belül bekövetkezzen, évekkal a transzplantáció után is leírták már a NODAT megjelenését vesetranszplantáltakban (278).

Vizsgálatunk során a de novo diabetes definíciójaként a Khalili és munkacsoportja által definiált perzisztens diabetes mellitust tekintettük (88). A vizsgálatból kizártuk azokat a betegeket, akik már a májátültetés előtt is cukorbetegségben szenvedtek, valamint nem vizsgáltuk az IFG és HCV közötti kapcsolatot sem. Tekintettel a kutatás retrospektív jellegére, az inzulin rezisztencia asszociációját a HCV infekcióval szintén nem tudtuk vizsgálni, ugyanis inzulin szintet rutinszerűen nem mérték ezekben a betegekben a diagnosztikai protokollon belül.

Saját anyagunkban a NODAT megjelenését a betegek 20%-ban észleltük, és a HCV infekció egyértelműen hajlamosított de novo diabetes mellitus kialakulására. Ez összhangban áll az irodalomban ismert adatokkal (87;88). A II.típusú diabetes jól ismert rizikófaktoraik közül az életkor és a BMI emelkedése májátültetés után is egyértelműen hajlamosít cukorbetegség kialakulására, emellett amennyiben a donor, vagy a recipiens férfi volt, szintén nagyobb eséllyel jelent meg NODAT (5. táblázat). Utóbbi szintén egyezik az irodalmi adatokkal (88). Habár vannak arra utaló adatok, hogy tacrolimus esetén magasabb a de novo diabetes aránya (88), mi ezt saját anyagunkban nem

figyeltük meg, emellett nem találtunk különbséget az akut rejekeciók számában és az emiatt szteroid lökéskezelésben részesült betegek számában sem a két csoport között. Ennek oka az lehet, hogy az átmeneti szénhidrát háztartás zavart (tranziens-diabetes) kizártuk a vizsgálatból, és a szteroid dózisának csökkentésével az inzulin rezisztencia is csökken.

NODAT megjelenése előrevetítette a HCV kiújulást, hamarabb és nagyobb arányban jelent meg ezekben a betegekben a HCV rekurrencia (5. táblázat). Ennek oka lehet az a megfigyelésünk, miszerint a de novo diabeteses HCV pozitív betegekben a vírus kópiaszám nagyobb mértékben emelkedett a műtét előtti értékekhez képest, és a közvetlen posztoperatív szakban mért magas HCV titer egy korábbi közlés szerint előrevetítette a HCV kiújulást (279). A rekurrencia miatt alkalmazott antivirális kezelés befejezésekor a de novo diabeteses betegek májbiopsziáinak szignifikánsan magasabb HAI értéke és fibrosis score-ja volt, mint azoknak a betegeknek a májbiopsziáinak, akiknél nem jelentkezett de novo diabetes (5. táblázat). Ez összhangban áll azzal a korábbi megfigyeléssel, miszerint az inzulin-rezisztencia rontja az antivirális kezelés hatásosságát (280). Ez fordítva is igaz azonban, az interferon kezelés hatással van az inzulin rezisztenciára. Egy tanulmányban a kombinált IFN-ribavirin kezelés végére az SVR-t elérő betegek HOMA-IR értéke szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kezelés kezdetekor (281). Egy másik vizsgálatban az SVR-t elérő betegekben jelentősen csökkent az emelkedett éhomi vércukor (IFG) és II. típusú diabetes mellitus incidenciája. Egy harmadik vizsgálatban úgy találták, hogy kifejezettebb inzulin rezisztencia esetén a beteg kevésbé reagált jól az antivirális kezelésre (280).

HCV pozitív betegek májbiopsziás mintáiban magasabb IRS-1/2 expressziót mértek SVR-es betegekben, mint non-responderekben, ez lehet az egyik oka annak, hogy tartós vírusválasz esetén mért csökken az inzulin rezisztencia (282). Az irodalmi adatokkal megegyezően (283) saját vizsgálatunkban is azt találtuk, hogy a de novo diabetes megjelenése rontotta a beteg túlélést (8. ábra), különösen hosszú távon. Tekintettel arra, hogy a közvetlen posztoperatív szakban fellépő szövődményekben nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált csoportokban, a túlélésben észlelt különbségek elsősorban a HCV rekurrencia eltérő progressziójában keresendők, azonban mindenféleképpen felmerül a kardiovaszkuláris szövődmények gyakoribb megjelenése is, ezek vizsgálata azonban nem képezte tárgyát jelen kutatásunknak.

Kutatásunk utolsó részében a hepatitis C vírus sejtbelépéséhez szükséges receptorok expresszióját vizsgáltuk. Vizsgálatunk célja a májátültetés után HCV rekurrencia miatt antivirális kezelésben részesült betegek májában expresszáldott HCV receptorok szintjének a mérése, valamint a CLDN-6 emberi májban történő expressziójának igazolása volt. Célunk volt azoknak a faktoroknak a feltárása, melyek befolyásolják a HCV receptorok expresszióját. Továbbá célul tűztük ki olyan HCV receptor expressziós mintázat keresését, amely előrevetítheti az antivirális kezelés sikerességét.

Mint azt az irodalmi háttér fejezetben részleteztem, a krónikus HCV infekció talaján kialakult máj cirrhosis vezető indikációja a májátültetésnek Európában. A transzplantáció után megjelenő HCV rekurrencia, mely univerzális jelenség, progrediáló máj fibrosissal és csökkent betegtúléléssel társul (284). Az antivirális kezelés révén elérhető tartós vírusmentesség (SVR) azonban lassítja a fibrosis progressióját (285), és növeli a graft-, és betegtúlélést (106). A Transzplantációs és Sebészeti Klinikán csak biopsziával igazolt HCV rekurrencia esetén kezdik meg az antivirális kezelést (pegilált IFN α kombinálva ribavirinnel). Kutatásunknak ebbe a részébe bevont 28 betegből 6 (21,4%) érte el a tartós vírusmentességet.

Az SVR egyik prediktív faktoraként említik az irodalomban az alacsony kezdeti HCV kópiaszámot, habár ezzel ellentétes közlések is megjelentek (39;116;124). A vizsgált beteganyagban az alacsony indulási HCV titer nem vetítette előre az SVR-t, a kezelésre jól reagáló betegekben szignifikánsan magasabb volt a rekurrencia idején szérumban mért HCV kópiaszám (12. ábra). Fontos megjegyezni, hogy igen kis esetszámot vizsgáltunk, messzemenő következtetéseket ezért nem lehet levonni az eredményeinkből az indulási HCV titer SVR-t előrevetítő erejére.

Mind az SVR, mind a non-responder csoportban szignifikánsan csökkent a kezelés végére a hepatitis súlyosságát jelző hisztológiai aktivitási index (HAI) (12. ábra), ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy a szignifikáns HCV titer csökkenés nélkül is csökkenti a gyulladás súlyosságát a kombinált antivirális kezelés. A fibrosis score érdemben nem változott a kezelés hatására (12. ábra), azonban itt ismételt ki kell emelni a kis esetszám eredmények értékelését korlátozó szerepét. Nagyobb esetszám vizsgálatával elképzelhető, hogy az egyes centrumok által közölt, SVR esetén megfigyelt lassabb fibrosis progressiót (104;105;124) észlelnénk a hazai beteganyagban is.

A májátültetés után történt rutin laborvizsgálatokat elemezve azt találtuk, hogy SVR esetén a szérum AST és ALT értékek szignifikánsan csökkentek a kezelés végére, míg non-responder betegekben ezt a javulást nem lehetett észlelni. Ennek oka feltehetőleg a vírustiterben észlelt különbségek lehetnek.

Az ismert HCV receptorok közül vizsgáltuk a CLDN-1-et és 6-ot, az occludint, valamint a CD81-et. A HCV receptorokat szinte kizárólag in vitro körülmények között vizsgálták eddig, mindössze három olyan tanulmány van, amikor emberi májokban is mérték ezek expresszióját, ezeket most részletesen ismertetem.

Reynolds és munkatársai 2007-ben közzölték eredményeiket normál és cirrhotikus májokban (HCV, ALD, PSC, PBC, AIH) mért CD81, SR-B1, illetve claudin-1 expresszióról (211). A méréseket öt alatti esetszámmal végezték. A receptorok expresszióját lokalizáció szerint osztályozták. Egészséges májszövetben a CLDN-1 expressziót a hepatocyták basolateralis és apicalis felszínén is leírták (döntően apicalisan), a CD81-et és SR-B1-et pedig főleg basolateralisan. Emellett CD81 expressziót észleltek még a sinusoidok endotheliumában is. Az epeutakban nem expresszálódott a CD81, ellenben a CLDN-1 az epeutakban igen erősen festődött. Egészséges és cirrhotikus májakat összehasonlítva azt találták, hogy a CLDN-1 expressziója magasabb volt a HCV cirrhotikus májokban, illetve a normál májához képest erősebb immunreakciót figyeltek meg a hepatocyták basolateralis felszínén. A másik két receptor expressziójában nem találtak különbséget sem kvantitatíve, sem a lokalizációt tekintve. A három HCV receptor transzkripciója során szintetizált mRNS-ek expresszióját nem vizsgálták.

Mensa és munkacsoportja a claudin-1, SR-B1 és occludin expressziót vizsgálta májátültetett betegekben (210). Biopsziákat vettek a reperfúziót követően (nullbiopszia), valamint a harmadik és 12. posztoperatív hónapban. Külön csoportosították a betegeket a vírusrekurrencia típusa alapján: enyhe (fibrosis hiánya vagy F1 fibrosis score 1 évvel a transzplantációt követően, illetve normál v.hepatica nyomás grádiens); súlyos (előrehaladott fibrosis -3 feletti score-, illetve emelkedett nyomás grádiens 1 évvel a transzplantációt követően); valamint cholestaticus. Kontroll mintáknak egyéb indikációból májtranszplantáción átesett betegek májbiopsziáit választottak. Az antivirális kezelés és az erre adott válasz hatása a receptorok expressziójára nem szerepelt a vizsgálatban. A fehérje expressziókat immunhisztokémiával vizsgálták.

Csakúgy, mint az előbb említett munkacsoport, ebben a vizsgálatban is úgy találták, hogy a CLDN-1 döntően a májsejtek apicalis felszínén expresszálódik, emellett az occludin expressziót is apicalisan figyelték meg, ami logikus is, hiszen mindkét fehérje alkotóeleme a tight junction-nek, ami az epcanaliculusok lezárásában elsődleges fontosságú. A reperfüzió kapcsán bekövetkezett HCV kópiaszám csökkenés korrelált az SR-B1 szinttel, tehát minél magasabb volt a májban mérhető SR-B1 expresszió, annál gyorsabban jutott be a HCV a hepatocytákba. Korrelált továbbá az első posztoperatív héten észlelt vírusszám emelkedés a CLDN-1 és occludin reperfüzió során mért fehérje szintjeivel, azaz minél magasabb volt a máj reperfüziója során e két fehérje mennyisége, annál több HCV partikulum keringett később a szérumban az első műtét utáni héten. Egy évvel a transzplantációt követően magasabb volt a CLDN-1 és occludin protein expresszió mind enyhe, mind súlyos rekurrenciát követően, mint a nullbiopszia idején. A kontroll csoportban ellenben nem volt emelkedett a CLDN-1 és occludin expresszió 1 évvel a transzplantáció után. Ez összhangban áll Reynolds és munkatársai eredményeivel, akik szintén úgy találták, hogy HCV fertőzött májakban magasabb volt a CLDN-1 expresszió, mint egészséges májszövetben. Cholestaticus rekurencia esetén szintén magasabb volt a CLDN-1 expresszió, mint enyhe rekurencia esetén. A HCV receptorok lokalizációjában nem találtak különbséget a különböző csoportokban. Reynolds és munkacsoportja úgy találta, hogy a CLDN-1 expresszió HCV cirrhotikus májakban magasabb volt a májsejtek basolateralis felszínén a normál májakban mérthez képest. A különbséget ez utóbbi tanulmányban részben metodikai különbségekkel, részben pedig azzal magyarázták, hogy míg az elsőként említett vizsgálatban cirrhotikus májakkal hasonlították össze a normál májakban mérhető HCV receptor expressziókat, addig Mensa és munkacsoportja HCV pozitív betegek nem cirrhotikus májbiopsziáit. Az mRNS szintek nem korreláltak a fehérje szintekkel, továbbá az mRNS expressziókban nem volt semmilyen különbség a különböző csoportok, illetve időpontok között, ebből azt a következtetést vonták le, hogy a vizsgált HCV receptorok szabályozása posttranszlációs szinten történik.

Nakamuta és munkacsoportja LDL-R, CD81, SR-B1, CLDN-1 és occludin expressziót vizsgált normál májszövetben és krónikus HCV hepatitisben, emellett szérum koleszterin szint és HCV core antigen mennyiségének hatását vizsgálták ezek expressziójára (195). Eredményeik döntően RT-PCR-el mért mRNS szinteken

alapszanak, immunhisztokémiát összesen 8 HCV pozitív és 3 normál májon készítettek. Az mRNS szinteket több, mint 100 beteg mintájából végezték. Az LDL-R mRNS szintet alacsonyabbnak találták HCV fertőzött májban, mint egészségesben, a CD81 és SR-B1 mRNS expresszióban nem találtak különbséget, a CLDN1 mRNS szintjét alacsonyabbnak, míg az occludin mRNS expressziót magasabbnak találták a kontrollhoz képest. A vizsgált HCV receptorok expressziói korreláltak egymással. A HCV core antigén és koleszterin mennyisége nem korrelált a HCV receptorok expressziójával. Immunhisztokémia alapján feltételezték, hogy a CLDN-1 és occludin expresszió magasabb krónikus HCV hepatitis esetén, mint egészséges májszövetben, ez az eredmény korrelál az előző kettő vizsgálatban igazoltakkal.

Az előbb részletezett három in vivo tanulmány egyikében sem vizsgálták az antivirális kezelés hatását a HCV receptorokra, továbbá csupán Mensa és munkacsoportja tanulmányában történtek a mérések májátültetett betegek májbiopsziáiban.

Kutatásunk első fázisában a CLDN-1 expressziót vizsgáltuk 12 beteg májbiopsziás mintáiban, akik közül hatan a kezelés végére vírusmentessé váltak (ETR), hatan viszont nem. Megállapítottuk, hogy szignifikánsan alacsonyabb CLDN-1 mRNS expressziót lehet mérni a HCV rekurrencia idején azokban a betegekben, akik a kezelés befejezésére elérték az ETR-t, mint azokban, akik nem (9. ábra). A logikus következtetés ebből az lenne, hogy minél kevesebb vírus receptor expresszálódik a májsejt plazmamembránjában, annál kevesebb HCV partikulum tud bejutni a sejtbe és ez a relatíve alacsony intracelluláris HCV titer eredményezheti azt, hogy ezek a betegek jobban reagálnak az IFN kezelésre. A fehérje expresszióban azonban nem tapasztaltuk ezt a különbséget a két csoport között (9. ábra), tehát hiába van különbség a CLDN-1 expresszióban a transzkripció szinten, a transláció szinten ez már nem látszik. Emellett a kutatásunk második fázisában, amikor kibővítettük a beteganyagot és módosítottuk a csoportosítást is (a kezelés sikerességének elfogadott fokmérőjét, a tartós vírusmentességet alapul véve), a HCV rekurrencia idején észlelt különbséget a két csoport között már az mRNS expressziókban sem tapasztaltuk (16. ábra). Ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy az antivirális kezelés, májátültetett betegekben, nem befolyásolja a CLDN-1 expressziót és fordítva, a hepatocyták plazmamembránjában expresszálódó CLDN-1 szintje érdemben nem befolyásolja az antivirális kezelés sikerességét. Csakúgy, mint azt már az előzőekben ismertetett tanulmányokban is láttuk

(210;211), mi is úgy találtuk, hogy a CLDN-1 elsősorban a hepatocytak plazmamembránjának apicalis felszínén, valamint az epeutakban expresszálódik (11. és 15. ábrák).

Vizsgáltuk, hogy a klinikai paraméterek közül valamelyik befolyásolja-e a CLDN-1 expressziót. Azt találtuk, hogy a fibrosis súlyossága pozitívan korrelál a CLDN-1 fehérje expresszióval (10. és 11. ábra). Ez teljes mértékben korrelál Reynolds és Mensa eredményeivel, hiszen előbbi tanulmányban cirrhotikus májakban magasabb CLDN-1 expressziót mértek, mint egészséges májszövetben, míg utóbbiban súlyosabb rekurrencia esetén szintén magasabb CLDN-1 expressziót mértek, és a rekurrencia súlyosságát elsősorban a fibrosis mértékétől tették függővé (210;211).

Kutatásunk második felében 28 beteg májbiopsziáit dolgoztuk fel, a betegeket aszerint csoportosítottuk, hogy elérték-e a tartós vírusmentességet, vagy sem. Ezenfelül a HCV receptor expressziókat beültetésre került donormájokban (normál) is vizsgáltuk.

Vizsgálatunk során sikerült igazolnunk a CLDN-6 fehérje expressziót emberi májban, mely mind egészséges, mind HCV fertőzött májszövetben expresszálódik (14. és 15. ábrák). HCV rekurrencia idején a CLDN-1 és CLDN-6 fehérje expressziót magasabbnak, míg a CD81 expressziót alacsonyabbnak találtuk a donormájokban mért szintekhez képest, ugyanakkor az occludin expresszió érdemben nem változott (14. és 15. ábrák). A CLDN-1 fehérje expresszióban talált eredményeink korrelálnak a Reynolds és Mensa által közöltekkel (HCV cirrhotikus májban magasabb volt a CLDN-1 expresszió, mint normál májban és egy évvel a transzplantáció után szintén magasabb volt a CLDN-1 expresszió HCV cirrhosis miatt májátültetésen átesett betegek májszövetében a nullbiopsziához képest, míg egyéb indikáció miatt májátültetésen átesett betegek azonos időpontban vett májbiopsziáiban ezt a különbséget nem találták) (210;211). A CD81 és occludin expresszióban kapott eredményeink azonban különböznek az eddig közöltektől, ugyanis Reynolds és munkacsoportja nem talált különbséget a CD81 expresszióban normál és HCV cirrhotikus májak között, Mensa és szerzőtársai pedig egy évvel a transzplantáció után magasabbnak találták az occludin expressziót HCV rekurrenciát követően a nullbiopsziában mérthez képest, míg egyéb indikáció miatt transzplantációban részesült betegekben ezt a differenciát nem észlelték (210;211). Az eredményeink eltérése az előbb említettektől több metodikai különbséggel magyarázható. Egyrésztől míg Reynolds és munkacsoportja cirrhotikus

májakat hasonlítottak össze egészséges májszövettel, addig az általunk vizsgált májbiopsziák fibrosis indexei alacsonyak voltak (átlagban 1 és 1,5 fibrosis score az SVR-es betegcsoportban és a non-responderekben), emellett mi immundeficiens betegekben vizsgáltuk a HCV receptorok expresszióit, mely hatása a HCV receptor expressziókra ismeretlen. Másrésztől míg Mensa és kutatócsoportja nullbiopsziákat (melyek az ő anyagukban a reperfúzió után vett májbiopsziát jelenti) hasonlítottak össze a transzplantáció után egy évvel vett májbiopsziákkal, addig mi „normál” kontrollnak a szervkivétel során, még intakt vérkeringés mellett vett májmintákat vettünk alapul. Továbbá mi nem a májátültetés után egy évvel vett májbiopsziákkal (melyek minden esetben a HCV kiújulást követően történtek) hasonlítottuk össze a kontroll mintákat, hanem a HCV rekurrencia idején vételezett májbiopsziákkal.

In vitro kutatások során szintén vizsgálták a perzisztáló HCV infekció befolyásoló szerepét a különböző HCV receptorok expresszióira. A CD81 esetében pl. a kezeletlen HCV permisszív sejtekhez képest a receptor csökkent és változatlan membrán expresszióját egyaránt leírták azokban a sejtvonalakban, melyeket huzamosabb ideig szekvenciálisan kezeltek HCVcc-vel. Emellett a tartós infekció során a sejtek egyre kevésbé voltak fogékonyak az újabb és újabb fertőzésre (207;208). Mindkét közlésben kihangsúlyozzák azonban, hogy a szuperinfekció kivédésében nem a CD81 expresszió változás, hanem a HCV RNS translációjának és replikációjának csökkenése a fő ok. Az in vitro talált eredmények alátámaszthatják eredményünket, miszerint a krónikus HCV hepatitis kialakulásáig (tehát a HCV rekurrencia diagnózisáig) csökken a CD81 expresszió a hepatocytak felszínén, ez ugyanis lehet a májsejtek védekező mechanizmusa a szuperinfekció kivédésére. Egy tanulmány beszámolt arról, hogy a CLDN-1 és occludin expresszió csökkent HCVcc-vel és HCVpp-vel fertőzött sejtekben, és ezt szintén a sejtek kompenzatorikus mechanizmusának tekintették a szuperinfekció kivédésére (251). Ugyanakkor olyan közlés is megjelent, melyben HCV permisszív sejtekben emelkedett CLDN-1 expressziót mértek HCVcc-vel történt infekciót követően (211).

A korábban közölt in vitro és in vivo kutatások, valamint saját eredményeink alapján elmondható, hogy a HCV kiújulás nem társul obligát módon emelkedett receptor szintekkel, a hepatocytak reinfekciójának és következményes krónikus hepatitis

kialakulásának nem előfeltétele az összes HCV receptor fokozott sejt felszíni expressziója.

Az immunhisztokémiai festések elemzése során azt találtuk, hogy a CLDN-1, a CLDN-6 és az occludin főleg a májsejtek apicalis felszínén, míg a CD81 csaknem kizárólag a sinusoidalis felszínen expresszálódik egészséges és HCV fertőzött májszövetben egyaránt (11., 15., 17. ábrák). A májsejteken kívül az epeutakban is kifejezett festődést találtunk a CLDN-1 és occludin, mérsékeltet a CLDN-6, és az immunreakció teljes hiányát a CD81 esetén. A CLDN-1, occludin és CD81 lokalizációjával kapcsolatos eredményeink megegyeznek az irodalomban már közölt adatokkal (210;211), a CLDN-6 expressziót azonban eddig emberi májszövetben még nem írták le. Az immunhisztokémiai eredményeink megerősítik a CLDN-1, CLDN-6, occludin és CD81 in vitro leírt funkcióját a HCV entryben. A CD81 a HCV sejtbelépésének viszonylag korai fázisában, közvetlenül a horgonyzó receptorokkal történt kötés létrejötte után vesz részt, így a májsejtek azon felszínén kell nagyobb mennyiségben előfordulnia, ahol a hepatocytá érintkezik a vérárammal, tehát a sinusoidalis felszínen. Ezzel szemben a CLDN-1, CLDN-6 és occludin tight junction fehérjék, az epcanaliculusokat zárják el a parenchymától, így a hepatocyták canalicularis felszínén fordulnak elő nagyobb számban, ott ahol a HCV entry befejeződik. Tekintettel arra, hogy utóbbi három receptor tight junction fehérje, nem meglepő, hogy a nagyobb intrahepaticus epeutak luminalis felszínén is festődtek.

A normál májakban és HCV rekurrencia során vett májbiopsziákban mért CLDN-1, CLDN-6, occludin és CD81 mRNS expressziók csak részben korrelálnak a fehérje expressziókkal (14. ábra). A CLDN-1 mRNS expresszió, a fehérje szinttel megegyezően, magasabb volt HCV rekurrencia esetén, mint a beültetésre került donormájokban, az occludin és CD81 expresszió érdemben nem változott, míg a CLDN-6 mRNS expresszió jelentősen csökkent a rekurrencia idejére. A CLDN-1 és occludin mRNS szintjeiben talált eredményeink különböznek a Nakamuta és munkatársai által közöltektől, akik úgy találták, hogy HCV hepatitis esetén a CLDN-1 mRNS expresszió alacsonyabb, míg az occludin mRNS expresszió magasabb volt a normál májakban mért értékekhez képest (195). Ezt a diskrepanciát újfent metodikai különbségekkel tudjuk magyarázni, ugyanis a saját vizsgálatunkban immunszuppresszív kezelésben részesülő betegekből származtak a májbiopsziák, míg Nakamuta és társai

immunkompetens betegeket vizsgáltak, és nem ismert az immunszuppresszív szerek hatása a CLDN-1, CLDN-6, occludin és CD81 transzkripció szabályozására.

A HCV rekurrencia miatt alkalmazott kombinált IFN-ribavirin kezelés a CLDN-1, CLDN-6, occludin és CD81 expresszióját nem befolyásolta érdemben transzkripció szinten. A kezelés egyedül a CD81 mRNS expressziót befolyásolta, non-responderekben ugyanis a kezelés végére megnőtt az expresszió a rekurrencia idején mért értékekhez képest, ebből azonban messzemenő következtetéseket nem lehet levonni.

A CD81 fehérje expressziót szintén nem befolyásolta érdemben az antivirális kezelés, a terápia befejezésekor továbbra is szignifikánsan alacsonyabb volt a szintje a donormájokban észlelthez képest, függetlenül attól, hogy a beteg jól, vagy rosszul reagált-e a kezelésre. Ebből az is következik, hogy a HCV titer és HAI változása nem befolyásolja érdemben a CD81 expressziót. Ezek alapján az is feltételezhető, hogy a CD81 expressziójának csökkenését a HCV rekurrencia idejére a donormájokban észlelt szinthez képest nem is a HCV reinfekció, hanem az immunszuppresszió okozza. 2001-ben Kronenberger és munkatársai a CD81 expressziót vizsgálták vérből izolált PBMC sejtekben, ezeket 10 HCV pozitív, nem transzplantált betegből vették (286). Ezenfelül primer human hepatocytákban is vizsgálták a CD81 expressziót, ehhez a sejteket máj rezekciók során eltávolított májszövetből nyerték. Az RNS expressziót RT-PCR-al, míg a fehérjét immuncitokémiával és FACS analízissel végezték. A primer human hepatocytákat és PBMC sejteket IFN-al kezelve azt találták, hogy a kezelés hatására a CD81 fehérje expresszió csökkent, míg az RNS expresszió nőtt. Azokban a betegekben, akiknél RVR alakult ki a kezelés megkezdése után 4 héttel, alacsonyabb CD81 expressziót lehetett kimutatni a PBMC sejtek plazmamembránjában, mint a kezelésre rosszul reagáló betegek PBMC sejtjeiben, de a különbség nem volt szignifikáns. Amennyiben PBMC és human hepatocytákat csak ribavirinnel kezeltek, nem találtak érdemi változást a CD81 expresszióban. Eredményeink részlegesen ellentmondanak a Kronenberger és munkatársai által közöltekkel, az IFN kezelés ugyanis a mi vizsgálatunkban nem befolyásolta a CD81 expressziót emberi májszövetben. A különböző eredmények metodikai különbségekkel magyarázhatók, míg ugyanis az idézett vizsgálatban PBMC sejtekben és izolált human hepatocytákban in vitro mérték a

CD81 expressziót, addig mi transzplantált betegekből vett májbiopsziákban tettük ugyanezt.

Szignifikánsan magasabb CLDN-6 fehérje expressziót lehetett mérni HCV rekurrencia idején a későbbi antivirális kezelés révén tartós vírusmentességet elérő betegeknél a non-responderekhez képest. Ezenkívül mind a CLDN-6, mind az occludin fehérje expresszió szignifikánsan csökkent az SVR csoportban a kezelés végére az indulási értékhez képest (16., 17. ábrák). A korreláció elemzések során azt találtuk, hogy a CLDN-6 fehérje expresszió erősen korrelál a vírustiterrel, de csak az SVR-es betegeknél, míg az occludin a Knodell score-al (függetlenül attól, hogy a beteg hogyan reagált a kezelésre). Az SVR-es betegeknél megfigyelt korreláció a CLDN-6 expresszió és a vírustiter között egyrészt magyarázhatja azt, hogy miért csökken le a kezelés végére a CLDN-6 szint ezekben a betegeknél. Ugyanakkor a vírustiterrel megfigyelt korreláció felveti annak is a lehetőségét, hogy a betegek májában mért magas kezelés előtti CLDN-6 fehérje szint nem oka a később bekövetkező SVR-nek, hanem pusztán következménye a vizsgált beteganyagban megfigyelt HCV kópia számbeli különbségeknek. Magasabb volt ugyanis a kezelés előtt a HCV titer azokban a betegeknél, akik később elérték az SVR-t, mint azokban, akik nem. A mintaszám emelésére van szükség, hogy ennek a kérdésnek a megválaszolására sort keríthessünk.

Érdekes, hogy a kezelés sikerétől függetlenül az occludin expresszió korrelációját találtuk a Knodell score-al, mégis csak a jól reagáló betegeknél csökken a kezelés végére az occludin fehérje expresszió (16., 17. ábrák). Számos olyan faktor lehet még a hepatitis súlyosságán kívül, mely befolyásolhatja az occludin expressziót, ez lehet a magyarázata a jól és rosszul reagáló betegek között észlelt különbségnek. In vitro úgy találták, hogy az SR-B1 expresszió csökken IFN kezelés hatására, méghozzá a fehérje gén promoterének STAT1/STAT2 jelátviteli utakon keresztüli negatív regulációja révén (287). Elképzelhető, hogy ez a jelátviteli rendszer befolyásolja az occludin transzkripcióját is, és ez a jelátviteli út különbözik az SVR-es betegeknél és non-responderekben, ez szintén további kutatásokat igényel.

Érdekes az is, hogy míg Mensa és munkacsoportja úgy találta, hogy korrelált a transzplantáció utáni első héten észlelt vírusszám emelkedés a graft reperfüziója során mért CLDN-1 és occludin fehérje szintjeivel (210), addig mi nem találtunk összefüggést a HCV kópiaszám és eme két vírusreceptor expressziója között. Ennek oka az eltérő

vizsgálati időpontokban kereshető. Mi a korreláció elemzéseket a HCV rekurrencia idején és az egy éves antivirális kezelés után futtattuk le, míg Mensa és kutatócsoportja az első posztoperatív héten, ezen időpontok között pedig a HCV partikulumok mennyisége a szérumban jelentősen változik (288).

Az mRNS és fehérje expressziókban észlelt különbségek (mind a normál máj vs. HCV rekurrencia, mind a non-responder vs. SVR összehasonlítások során) felvetik a lehetőségét microRNS-ek által történő génszabályozásnak. A microRNS-ek apró, nem kódoló RNS szakaszok, melyek a génexpressziót befolyásolják a poszttranszkripció szinten azáltal, hogy a target mRNS-hez történt kötés révén vagy destabilizálják az mRNS-t, vagy gátolják a translációt és így nem képződik róluk fehérje (összefoglalva (289)). A microRNS-ek számos fiziológias és patológias sejtfolyamat regulációjában szerepet játszanak, többek között a vírusinfekciókban és a daganatok kialakulásában is (290;291). A microRNS-ek szerepe a HCV receptorok expressziójának regulációjában így további kutatásokat igényel.

Összefoglalásként elmondható, hogy több HCV receptor expressziója változik májátültetés után, és ezek szintje függ attól, hogy a beteg hogyan reagált az antivirális kezelésre, illetve, ezek szintjétől függhet az, hogy a beteg hogyan fog reagálni a kezelésre. További kutatásokra van szükség az eddig nem vizsgált HCV receptorok expressziói és az antivirális terápia közötti összefüggések feltárására is, hogy a vírusreceptorok alaposabb megismerésével új antivirális kezelési sémákat dolgozhassunk ki. A HCV receptorok ellen termelt antitestek terápiás céllal történő felhasználása intenzív kutatás alatt áll, a vizsgálatok egyelőre azonban még csak sejtenyészetekben történtek (19).

8. Következtetések

- **A megfelelő donor-recipiens párosítás fontos tényező a májátültetés eredményeinek javításában. Marginális donorból származó máj beültetése magas rizikójú recipiensbe jelentősen emeli a közvetlen posztoperatív komplikációk számát és rontja a rövid távú betegtúlélést. Marginális máj beültetése a relatíve jó általános állapotú, alacsony rizikójú betegekbe javasolt.**
- **A de novo diabetes mellitus kialakulása gyakori kísérőjelensége a HCV kiújulásnak, emellett fennállása esetén a HCV rekurrencia kórlefolyásának progressziója gyorsabb.**
- **A de novo diabetes mellitus rontja a betegtúlélést.**
- **A CLDN-6 fehérje expresszálódik emberi májban.**
- **A CLDN-1, CLDN-6 és occludin főleg a májsejtek apicalis felszínén, míg a CD81 csaknem kizárólag a sinusoidalis felszínen expresszálódik egészséges és HCV fertőzött májszövetben egyaránt.**
- **A HCV rekurrenciának nem előfeltétele az összes HCV receptor fokozott sejtfelszíni expressziója.**
- **Az antivirális kezelés, májátültetett betegekben, nem befolyásolja a hepatocytak plazmamembránjában észlelt CLDN-1 és CD81 expressziót és fordítva, a hepatocytak plazmamembránjában expresszálódó CLDN-1 és CD81 szintje érdemben nem befolyásolja az antivirális kezelés sikerességét.**
- **A kezelés kezdetekor mért magas CLDN-6 fehérje expresszió előrevetítheti a tartós vírusmentességet (SVR).**
- **Az antivirális kezelés hatására a CLDN-6 és occludin fehérje expresszió csökken a terápia végére, de csak SVR esetén.**
- **A CLDN-1 fehérje expresszió korrelál a májfibrosis mértékével.**
- **A CLDN-6 fehérje expresszió erősen korrelál a vírustiterrel, de csak az SVR-es betegekben, míg az occludin korrelációja a hisztológiai aktivitási index-el független attól, hogy a beteg hogyan reagált a kezelésre.**

9. Összefoglalás

A májátültetés (OLT) egyik leggyakoribb indikációja a hepatitis C vírus (HCV) fertőzés által okozott májcirrhosis. A májátültetés utáni HCV kiújulás idő kérdése, a betegek jelentős részében újra cirrhosis alakul ki a műtét után. A kombinált antivirális kezelés hatására a betegek harmadában alakul ki tartós vírusmentesség (SVR), mely lassítja a fibrosis progressiot. Munkám során vizsgáltam a donor-recipient párosítás és a májátültetés utáni de novo diabetes mellitus (NODAT) kapcsolatát a HCV kiújulással, továbbá, hogy változik-e a HCV sejbelépéséhez szükséges receptorok közül a claudin-1, claudin-6, CD81 és occludin expressziója a HCV kiújulás, illetve az antivirális kezelés hatására. Ezeket a HCV receptorokat szinte kizárólag in vitro vizsgálták, a claudin-6 fehérjét emberi májban még nem mutatták ki. Marginális donorból származó máj beültetése magas rizikójú recipientbe emelte a posztoperatív komplikációk számát és rontotta a rövid távú beteg túlélést, de nem volt hatása a HCV rekurrencia gyakoriságára és a fibrosis progressiójára. Ez a jelenség ellentétes a nemzetközi leírásokkal, és a hazai donorválasztással magyarázható. A NODAT kialakulása gyakori kísérőjelensége volt a HCV kiújulásnak, emellett fennállása esetén a HCV rekurrencia progressiója gyorsabb volt. A claudin-6 fehérje expressziót sikerült kimutatnunk emberi májban: főleg a májsejtek apicalis felszínén expresszálódik gyulladásmentes és HCV fertőzött májszövetben egyaránt. Emelkedett claudin-1 és claudin-6, ellenben csökkent CD81 expressziót találtunk HCV rekurrencia idején a donormájokban mért értékekhez képest. A kezelés kezdetekor a non-responder betegekhez képest magasabb claudin-6 expressziót mértünk azoknál, akik később elérték az SVR-t. Az antivirális kezelés hatására a claudin-6 és occludin expresszió csökkent a terápia végére, de csak SVR esetén. A claudin-6 expresszió erősen korrelált a vírustiterrel, de csak az SVR betegekben, míg az occludin korrelációja a hisztológiai aktivitási index-el független volt attól, hogy a beteg hogyan reagált a kezelésre. A claudin-1 expresszió a májfibrosis mértékével korrelált. További kutatások elősegíthetik a HCV receptorok expressziója és az antivirális terápia közötti összefüggések feltárását, és a vírusreceptorok alaposabb megismerését.

9. Summary

Hepatitis C virus (HCV) caused liver cirrhosis is one of the leading indications of liver transplantation (OLT). HCV recurrence after liver transplantation is universal and results in liver cirrhosis in many cases after OLT. Only one-third of patients achieve SVR, which is associated with a deceleration fibrosis progression. In the course of my work, I studied the influence of donor-recipient matching and de novo diabetes mellitus on HCV recurrence. I also examined the expressional changes of HCV receptor claudin-1, claudin-6, CD81 and occludin at the time of HCV recurrence and after the antiviral therapy. These proteins have been examined mainly in vitro. Moreover, there is no data about CLDN-6 protein expression in the human liver. In the early postoperative setting, the rate of postoperative complications was higher and patient survival was lower, in case of matching high risk patients with ECD grafts. However, the donor-recipient matching had no influence on the rate of HCV recurrence or on the fibrosis progression. These latter results contradict to previous findings of other publications and can be explained by the strict Hungarian donor selection criteria. NODAT appeared to be associated with HCV recurrence and the accelerated progression of HCV recurrence. We were able to detect claudin-6 protein expression in the human liver, which was detectable mainly at the apical surfaces of hepatocytes both in normal and in HCV infected liver tissues. Claudin-1 and claudin-6 protein levels significantly increased while CD81 protein expression declined at the time of HCV recurrence in comparison to donor liver. At the beginning of the therapy, claudin-6 expression was higher in patients who achieved SVR later than in non-responders. Claudin-6 and occludin levels declined following antiviral therapy only in SVR patients. Claudin-6 expression showed a positive correlation with HCV titer in SVR patients, while occludin correlated positively with histology activity index (HAI) in all patients. Claudin-1 expression correlated with the severity of liver fibrosis. Further studies can improve our knowledge of the connection between HCV receptor expression and the effect of antiviral therapy.

10. Irodalmi hivatkozások

1. Osztrogonacz H, Gerevich J, Horvath G, Tolvaj G, David K. [Prevalence of chronic viral hepatitis in drug abusers]. *Orv Hetil* 2000; 141: 715-8.
2. Par A, Kantor I, Barcsay E, Hollos I, Mezey I, Brojnas J, Takacs M, Hejjas M, Illes M, Szontagh L, . Prevalence of antibody to hepatitis C virus in blood donors, high-risk groups and patients with liver diseases in Hungary. A multicentre study using ABBOTT EIA test and a comparison with an ORTHO ELISA test system. *Acta Med Hung* 1991; 48: 167-76.
3. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558-67.
4. Ryder SD. Outcome of hepatitis C infection: bleak or benign? *J Hepatol* 2007; 47: 4-6.
5. Hwang SJ. Hepatitis C virus infection: an overview. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34: 227-34.
6. Mathei C, Buntinx F, van Damme P. Seroprevalence of hepatitis C markers among intravenous drug users in western European countries: a systematic review. *J Viral Hepat* 2002; 9: 157-73.
7. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31 Suppl 1: 54-60.
8. McOmish F, Chan SW, Dow BC, Gillon J, Frame WD, Crawford RJ, Yap PL, Follett EA, Simmonds P. Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion* 1993; 33: 7-13.
9. Simmonds P, Mellor J, Craxi A, Sanchez-Tapias JM, Alberti A, Prieto J, Colombo M, Rumi MG, Lo IO, Ampurdanes-Mingall S, Forns-Bernhardt X, Chemello L, Civeira MP, Frost C, Dusheiko G. Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients. *J Hepatol* 1996; 24: 517-24.
10. Gervain J, Simon G, Jr., Papp I, Szabone BK. [Determination of the type and subtype of the hepatitis C virus in chronic viral hepatitis patients in Hungary]. *Orv Hetil* 2001; 142: 1315-9.

11. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
12. Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M, Bradley DW. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990; 46: 423-41.
13. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 2004; 63: 71-180.
14. Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002; 76: 5326-38.
15. Yamada N, Tanihara K, Takada A, Yorihuzi T, Tsutsumi M, Shimomura H, Tsuji T, Date T. Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 1996; 223: 255-61.
16. Bartenschlager R, Sparacio S. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res* 2007; 127: 195-207.
17. Ray RB, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996; 226: 176-82.
18. Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 2009; 90: 1055-70.
19. Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, Baumert TF. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol* 2011; 54: 566-76.
20. Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, Rice CM, Dubuisson J. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 1997; 71: 697-704.
21. Vieyres G, Thomas X, Descamps V, Duverlie G, Patel AH, Dubuisson J. Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* 2010; 84: 10159-68.
22. Kobayashi M, Bennett MC, Bercot T, Singh IR. Functional analysis of hepatitis C virus envelope proteins, using a cell-cell fusion assay. *J Virol* 2006; 80: 1817-25.

23. Lavillette D, Pecheur EI, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, Dreux M, Penin F, Cosset FL. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol* 2007; 81: 8752-65.
24. Helle F, Goffard A, Morel V, Duverlie G, McKeating J, Keck ZY, Fong S, Penin F, Dubuisson J, Voisset C. The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol* 2007; 81: 8101-11.
25. Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, Ciesek S, Friesland M, Herrmann E, Zeisel MB, Baumert TF, Keck ZY, Fong SK, Pecheur EI, Pietschmann T. Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol* 2010; 84: 5751-63.
26. Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 1994; 68: 5045-55.
27. Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 2006; 442: 831-5.
28. Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1473-82.
29. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76: 5974-84.
30. Ciccaglione AR, Costantino A, Tritarelli E, Marcantonio C, Equestre M, Marziliano N, Rapicetta M. Activation of endoplasmic reticulum stress response by hepatitis C virus proteins. *Arch Virol* 2005; 150: 1339-56.
31. Tardif KD, Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiol* 2005; 13: 159-63.
32. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-9.
33. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Shimotohno K. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 220-8.

34. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, . A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-4.
35. Bialek SR, Terrault NA. The changing epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 697-715.
36. Jacobson IM, Cacoub P, Dal Maso L, Harrison SA, Younossi ZM. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 1017-29.
37. Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, McCaughan GW, George J. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology* 2003; 125: 1695-704.
38. Muzzi A, Leandro G, Rubbia-Brandt L, James R, Keiser O, Malinverni R, Dufour JF, Helbling B, Hadengue A, Gonvers JJ, Mullhaupt B, Cerny A, Mondelli MU, Negro F. Insulin resistance is associated with liver fibrosis in non-diabetic chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2005; 42: 41-6.
39. Romero-Gomez M, Del M, V, Andrade RJ, Salmeron J, Diago M, Fernandez-Rodriguez CM, Corpas R, Cruz M, Grande L, Vazquez L, Munoz-De-Rueda P, Lopez-Serrano P, Gila A, Gutierrez ML, Perez C, Ruiz-Extremera A, Suarez E, Castillo J. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005; 128: 636-41.
40. Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol* 2008; 128: 133-47.
41. Gale M, Jr., Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436: 939-45.
42. Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2006; 69: 129-41.
43. Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001; 75: 7059-66.
44. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65-91.

45. Frese M, Schwarzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002; 35: 694-703.
46. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 2001; 106: 259-62.
47. Heller T, Rehermann B. Acute hepatitis C: a multifaceted disease. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 7-17.
48. Wang JH, Layden TJ, Eckels DD. Modulation of the peripheral T-Cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: transition from a Th1 to a Th2 response. *Hum Immunol* 2003; 64: 662-73.
49. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002; 195: 43-9.
50. Deignan T, Curry MP, Doherty DG, Golden-Mason L, Volkov Y, Norris S, Nolan N, Traynor O, McEntee G, Hegarty JE, O'Farrelly C. Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 2002; 37: 101-8.
51. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000; 106: 1239-49.
52. Konan KV, Giddings TH, Jr., Ikeda M, Li K, Lemon SM, Kirkegaard K. Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus. *J Virol* 2003; 77: 7843-55.
53. Szabo G, Dolganiuc A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology* 2005; 210: 237-47.
54. Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003; 77: 4070-80.
55. Siavoshian S, Abraham JD, Thumann C, Kieny MP, Schuster C. Hepatitis C virus core, NS3, NS5A, NS5B proteins induce apoptosis in mature dendritic cells. *J Med Virol* 2005; 75: 402-11.

56. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003; 38: 1437-48.
57. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. *NIH Consensus State Sci Statements* 2002; 19: 1-46.
58. Gehring S, Gregory SH, Kuzushita N, Wands JR. Type 1 interferon augments DNA-based vaccination against hepatitis C virus core protein. *J Med Virol* 2005; 75: 249-57.
59. Fang SH, Hwang LH, Chen DS, Chiang BL. Ribavirin enhancement of hepatitis C virus core antigen-specific type 1 T helper cell response correlates with the increased IL-12 level. *J Hepatol* 2000; 33: 791-8.
60. Welker MW, Zeuzem S. Occult hepatitis C: how convincing are the current data? *Hepatology* 2009; 49: 665-75.
61. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-82.
62. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-65.
63. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49: 1335-74.
64. Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML, Smith CI, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Chaneac M, Reddy KR. Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* 2005; 43: 425-33.
65. Fried MW, Hadziyannis SJ, Shiffman ML, Messinger D, Zeuzem S. Rapid virological response is the most important predictor of sustained virological response across genotypes in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; 55: 69-75.
66. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic

variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401.

67. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003; 4: 69-77.

68. Donnelly RP, Sheikh F, Kotenko SV, Dickensheets H. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 314-21.

69. Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, Neuhaus P, Lerut J, Salizzoni M, Pollard S, Muhlbacher F, Rogiers X, Garcia Valdecasas JC, Berenguer J, Jaeck D, Moreno GE. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 2003; 9: 1231-43.

70. Nemes B, Sarvary E, Gerlei Z, Fazakas J, Doros A, Nemeth A, Gorog D, Fehervari I, Mathe Z, Galffy Z, Par A, Schuller J, Telegdy L, Feher J, Lotz G, Schaff Z, Nagy P, Jaray J, Lengyel G. [The recurrence of hepatitis C virus after liver transplantation]. *Orv Hetil* 2007; 148: 1971-9.

71. Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: S14-S18.

72. Gane EJ, Naoumov NV, Qian KP, Mondelli MU, Maertens G, Portmann BC, Lau JY, Williams R. A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology* 1996; 110: 167-77.

73. Thuluvath PJ, Krok KL, Segev DL, Yoo HY. Trends in post-liver transplant survival in patients with hepatitis C between 1991 and 2001 in the United States. *Liver Transpl* 2007; 13: 719-24.

74. Rosen HR, Hinrichs DJ, Gretch DR, Koziel MJ, Chou S, Houghton M, Rabkin J, Corless CL, Bower HG. Association of multispecific CD4(+) response to hepatitis C and severity of recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology* 1999; 117: 926-32.

75. Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F. Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9: S1-S9.

76. Doughty AL, Spencer JD, Cossart YE, McCaughan GW. Cholestatic hepatitis after liver transplantation is associated with persistently high serum hepatitis C virus RNA levels. *Liver Transpl Surg* 1998; 4: 15-21.
77. Berenguer M, Prieto M, San Juan F, Rayon JM, Martinez F, Carrasco D, Moya A, Orbis F, Mir J, Berenguer J. Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2002; 36: 202-10.
78. Wali M, Harrison RF, Gow PJ, Mutimer D. Advancing donor liver age and rapid fibrosis progression following transplantation for hepatitis C. *Gut* 2002; 51: 248-52.
79. Heidenhain C, Heise M, Jonas S, Ben Asseur M, Puhl G, Mittler J, Thelen A, Schmidt S, Langrehr J, Neuhaus P. Retrograde reperfusion via vena cava lowers the risk of initial nonfunction but increases the risk of ischemic-type biliary lesions in liver transplantation--a randomized clinical trial. *Transpl Int* 2006; 19: 738-48.
80. Berenguer M. Host and donor risk factors before and after liver transplantation that impact HCV recurrence. *Liver Transpl* 2003; 9: S44-S47.
81. Arenas JI, Vargas HE, Rakela J. The use of hepatitis C-infected grafts in liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9: S48-S51.
82. Berenguer M. Risk of extended criteria donors in hepatitis C virus-positive recipients. *Liver Transpl* 2008; 14 Suppl 2: S45-S50.
83. Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122: 889-96.
84. Zekry A, Bishop GA, Bowen DG, Gleeson MM, Guney S, Painter DM, McCaughan GW. Intrahepatic cytokine profiles associated with posttransplantation hepatitis C virus-related liver injury. *Liver Transpl* 2002; 8: 292-301.
85. Allison ME, Wrehitt T, Palmer CR, Alexander GJ. Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol* 1994; 21: 1135-9.
86. Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 29: 328-33.

87. Bigam DL, Pennington JJ, Carpentier A, Wanless IR, Hemming AW, Croxford R, Greig PD, Lilly LB, Heathcote JE, Levy GA, Cattral MS. Hepatitis C-related cirrhosis: a predictor of diabetes after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 87-90.
88. Khalili M, Lim JW, Bass N, Ascher NL, Roberts JP, Terrault NA. New onset diabetes mellitus after liver transplantation: the critical role of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2004; 10: 349-55.
89. Hickman IJ, Powell EE, Prins JB, Clouston AD, Ash S, Purdie DM, Jonsson JR. In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated with hepatic fibrosis: implications for therapy. *J Hepatol* 2003; 39: 1042-8.
90. Davidson JA, Wilkinson A. New-Onset Diabetes After Transplantation 2003 International Consensus Guidelines: an endocrinologist's view. *Diabetes Care* 2004; 27: 805-12.
91. Burak KW, Kremers WK, Batts KP, Wiesner RH, Rosen CB, Razonable RR, Paya CV, Charlton MR. Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcomes after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: 362-9.
92. Pelletier SJ, Raymond DP, Crabtree TD, Berg CL, Iezzoni JC, Hahn YS, Sawyer RG, Pruett TL. Hepatitis C-induced hepatic allograft injury is associated with a pretransplantation elevated viral replication rate. *Hepatology* 2000; 32: 418-26.
93. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayon M, Cordoba J, Herola A, Ascher N, Mir J, Berenguer J, Wright TL. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000; 32: 673-84.
94. Baron PW, Sindram D, Higdon D, Howell DN, Gottfried MR, Tuttle-Newhall JE, Clavien PA. Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000; 6: 407-12.
95. Berenguer M. Hot topic in hepatitis C virus research: the type of immunosuppression does not matter. *Liver Transpl* 2011; 17 Suppl 3: S24-S28.
96. Jiang H, Sugu H, Takahara S, Takano Y, Li D, Kameoka H, Moutabarrik A, Kokado Y, Ishibashi M, Okuyama A, . Combined immunosuppressive effect of FK 506 and other immunosuppressive agents on PHA- and CD3-stimulated human lymphocyte proliferation in vitro. *Transplant Proc* 1991; 23: 2933-6.

97. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000; 47: 119-25.
98. Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, Kurosaki M, Maekawa S, Yamashiro T, Chen CH, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 42-7.
99. Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 2005; 19: 111-22.
100. Berenguer M, Aguilera V, San Juan F, Benlloch S, Rubin A, Lopez-Andujar R, Moya A, Pareja E, Montalva E, Yago M, de Juan M, Mir J, Prieto M. Effect of calcineurin inhibitors in the outcome of liver transplantation in hepatitis C virus-positive recipients. *Transplantation* 2010; 90: 1204-9.
101. Lake JR. The role of immunosuppression in recurrence of hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9: S63-S66.
102. Berenguer M, Aguilera V, Prieto M, Carrasco D, Rayon M, San Juan F, Landaverde C, Mir J, Berenguer J. Delayed onset of severe hepatitis C-related liver damage following liver transplantation: a matter of concern? *Liver Transpl* 2003; 9: 1152-8.
103. Carrion JA, Navasa M, Forns X. Retransplantation in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 2010; 53: 962-70.
104. Bahra M, Neumann UP, Jacob D, Langrehr JM, Berg T, Neuhaus R, Neuhaus P. Fibrosis progression in hepatitis C positive liver recipients after sustained virologic response to antiviral combination therapy (interferon-ribavirin therapy). *Transplantation* 2007; 83: 351-3.
105. Bizollon T, Pradat P, Mabrut JY, Radenne S, Ducerf C, Baulieux J, Souquet JC, Trepo C. Histological benefit of retreatment by pegylated interferon alfa-2b and ribavirin in patients with recurrent hepatitis C virus infection posttransplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 448-53.
106. Picciotto FP, Tritto G, Lanza AG, Addario L, De Luca M, Di Costanzo GG, Lampasi F, Tartaglione MT, Marsilia GM, Calise F, Cuomo O, Ascione A. Sustained

virological response to antiviral therapy reduces mortality in HCV reinfection after liver transplantation. *J Hepatol* 2007; 46: 459-65.

107. Firpi RJ, Abdelmalek MF, Soldevila-Pico C, Reed A, Hemming A, Howard R, Van Der WW, Lauwers G, Liu C, Crawford JM, Davis GL, Nelson DR. Combination of interferon alfa-2b and ribavirin in liver transplant recipients with histological recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: 1000-6.

108. Giostra E, Kullak-Ublick GA, Keller W, Fried R, Vanlemmens C, Kraehenbuhl S, Locher S, Egger HP, Clavien PA, Hadengue A, Mentha G, Morel P, Negro F. Ribavirin/interferon-alpha sequential treatment of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transpl Int* 2004; 17: 169-76.

109. Narayanan Menon KV, Poterucha JJ, El Amin OM, Burgart LJ, Kremers WK, Rosen CB, Wiesner RH, Charlton M. Treatment of posttransplantation recurrence of hepatitis C with interferon and ribavirin: lessons on tolerability and efficacy. *Liver Transpl* 2002; 8: 623-9.

110. Chalasani N, Manzarbeitia C, Ferenci P, Vogel W, Fontana RJ, Voigt M, Riely C, Martin P, Teperman L, Jiao J, Lopez-Talavera JC. Peginterferon alfa-2a for hepatitis C after liver transplantation: two randomized, controlled trials. *Hepatology* 2005; 41: 289-98.

111. Sheiner PA, Boros P, Klion FM, Thung SN, Schluger LK, Lau JY, Mor E, Bodian C, Guy SR, Schwartz ME, Emre S, Bodenheimer HC, Jr., Miller CM. The efficacy of prophylactic interferon alfa-2b in preventing recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 1998; 28: 831-8.

112. Shergill AK, Khalili M, Straley S, Bollinger K, Roberts JP, Ascher NA, Terrault NA. Applicability, tolerability and efficacy of preemptive antiviral therapy in hepatitis C-infected patients undergoing liver transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 118-24.

113. Singh N, Gayowski T, Wannstedt CF, Shakil AO, Wagener MM, Fung JJ, Marino IR. Interferon-alpha for prophylaxis of recurrent viral hepatitis C in liver transplant recipients: a prospective, randomized, controlled trial. *Transplantation* 1998; 65: 82-6.

114. Gane EJ, Lo SK, Riordan SM, Portmann BC, Lau JY, Naoumov NV, Williams R. A randomized study comparing ribavirin and interferon alfa monotherapy for hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 1403-7.

115. Rodriguez-Luna H, Khatib A, Sharma P, De Petris G, Williams JW, Ortiz J, Hansen K, Mulligan D, Moss A, Douglas DD, Balan V, Rakela J, Vargas HE. Treatment of recurrent hepatitis C infection after liver transplantation with combination of pegylated interferon alpha2b and ribavirin: an open-label series. *Transplantation* 2004; 77: 190-4.
116. Samuel D, Bizollon T, Feray C, Roche B, Ahmed SN, Lemonnier C, Cohard M, Reynes M, Chevallier M, Ducerf C, Baulieux J, Geffner M, Albrecht JK, Bismuth H, Trepo C. Interferon-alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C after liver transplantation: a randomized study. *Gastroenterology* 2003; 124: 642-50.
117. Carrion JA, Navasa M, Garcia-Retortillo M, Garcia-Pagan JC, Crespo G, Bruguera M, Bosch J, Forns X. Efficacy of antiviral therapy on hepatitis C recurrence after liver transplantation: a randomized controlled study. *Gastroenterology* 2007; 132: 1746-56.
118. Fernandez I, Meneu JC, Colina F, Garcia I, Munoz R, Castellano G, Fuertes A, Abradelo M, Lumbreras C, Moreno E, Solis-Herruzo JA. Clinical and histological efficacy of pegylated interferon and ribavirin therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 1805-12.
119. Hanouneh IA, Miller C, Aucejo F, Lopez R, Quinn MK, Zein NN. Recurrent hepatitis C after liver transplantation: on-treatment prediction of response to peginterferon/ribavirin therapy. *Liver Transpl* 2008; 14: 53-8.
120. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-801.
121. Berenguer M, Aguilera V, Prieto M, San Juan F, Rayon JM, Benlloch S, Berenguer J. Effect of calcineurin inhibitors on survival and histologic disease severity in HCV-infected liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2006; 12: 762-7.
122. Gordon FD, Kwo P, Vargas HE. Treatment of hepatitis C in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2009; 15: 126-35.
123. Cescon M, Grazi GL, Cucchetti A, Vetrone G, Ravaioli M, Ercolani G, Morelli MC, Piscaglia F, Tame M, Pinna AD. Predictors of sustained virological response after antiviral treatment for hepatitis C recurrence following liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 782-9.

124. Schmidt SC, Bahra M, Bayraktar S, Berg T, Schmeding M, Pratschke J, Neuhaus P, Neumann U. Antiviral treatment of patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation with pegylated interferon. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2063-9.
125. Megyesi C, Samols E, Marks V. Glucose tolerance and diabetes in chronic liver disease. *Lancet* 1967; 2: 1051-6.
126. Delgado-Borrego A, Casson D, Schoenfeld D, Somsouk M, Terella A, Jordan SH, Bhan A, Baid S, Cosimi AB, Pascual M, Chung RT. Hepatitis C virus is independently associated with increased insulin resistance after liver transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 703-10.
127. Knobler H, Schattner A. Association of hepatitis C and diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2001; 135: 141.
128. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994; 269: 1-4.
129. Kadowaki T, Koyasu S, Nishida E, Tobe K, Izumi T, Takaku F, Sakai H, Yahara I, Kasuga M. Tyrosine phosphorylation of common and specific sets of cellular proteins rapidly induced by insulin, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in an intact cell. *J Biol Chem* 1987; 262: 7342-50.
130. Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997; 272: 11439-43.
131. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-7.
132. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, III, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994; 372: 186-90.
133. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391: 900-4.
134. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-9.
135. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, Taniguchi E, Kumemura H, Hanada S, Maeyama M, Baba S, Koga H, Kumashiro R, Ueno T, Ogata H, Yoshimura A, Sata M. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1

and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 2004; 165: 1499-508.

136. Kruszynska YT, Home PD, McIntyre N. Relationship between insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 103-11.

137. Sougleri M, Labropoulou-Karatza C, Paraskevopoulou P, Fragopanagou H, Alexandrides T. Chronic hepatitis C virus infection without cirrhosis induces insulin resistance in patients with alpha-thalassaemia major. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1195-9.

138. Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology* 2003; 38: 1384-92.

139. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5434-46.

140. Serste T, Nkuize M, Moucari R, Van Gossum M, Reynders M, Scheen R, Vertongen F, Buset M, Mulkey JP, Marcellin P. Metabolic disorders associated with chronic hepatitis C: impact of genotype and ethnicity. *Liver Int* 2010; 30: 1131-6.

141. Garg A, Misra A. Hepatic steatosis, insulin resistance, and adipose tissue disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3019-22.

142. Benhamou PY, Penfornis A. Natural history, prognosis, and management of transplantation-induced diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 2002; 28: 166-75.

143. AlDosary AA, Ramji AS, Elliott TG, Sirrs SM, Thompson DM, Erb SR, Steinbrecher UP, Yoshida EM. Post-liver transplantation diabetes mellitus: an association with hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: 356-61.

144. John PR, Thuluvath PJ. Outcome of patients with new-onset diabetes mellitus after liver transplantation compared with those without diabetes mellitus. *Liver Transpl* 2002; 8: 708-13.

145. Lopez MM, Valenzuela JE, Alvarez FC, Lopez-Alvarez MR, Cecilia GS, Paricio PP. Long-term problems related to immunosuppression. *Transpl Immunol* 2006; 17: 31-5.

146. Huang HC, Chuang CS, Hsieh YY, Chang TS, Wei KL, Shen CH, Wu CS, Tung SY. Serum HCV RNA level is not associated with insulin resistance and metabolic syndrome in chronic hepatitis C patients with genotype 1 or 2 infection. *Chang Gung Med J* 2011; 34: 487-95.
147. Cameron AM, Ghobrial RM, Yersiz H, Farmer DG, Lipshutz GS, Gordon SA, Zimmerman M, Hong J, Collins TE, Gornbein J, Amersi F, Weaver M, Cao C, Chen T, Hiatt JR, Busuttil RW. Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Ann Surg* 2006; 243: 748-53.
148. Busuttil RW, Goss JA. Split liver transplantation. *Ann Surg* 1999; 229: 313-21.
149. Miller CM. Regulation and oversight of adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9: S69-S72.
150. Lopez-Navidad A, Caballero F. Extended criteria for organ acceptance. Strategies for achieving organ safety and for increasing organ pool. *Clin Transplant* 2003; 17: 308-24.
151. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124: 91-6.
152. Azoulay D, Linhares MM, Huguet E, Delvart V, Castaing D, Adam R, Ichai P, Saliba F, Lemoine A, Samuel D, Bismuth H. Decision for retransplantation of the liver: an experience- and cost-based analysis. *Ann Surg* 2002; 236: 713-21.
153. Ghobrial RM, Gornbein J, Steadman R, Danino N, Markmann JF, Holt C, Anselmo D, Amersi F, Chen P, Farmer DG, Han S, Derazo F, Saab S, Goldstein LI, McDiarmid SV, Busuttil RW. Pretransplant model to predict posttransplant survival in liver transplant patients. *Ann Surg* 2002; 236: 315-22.
154. Ghabril M, Dickson R, Wiesner R. Improving outcomes of liver retransplantation: an analysis of trends and the impact of Hepatitis C infection. *Am J Transplant* 2008; 8: 404-11.
155. von Hahn T, Rice CM. Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 2008; 283: 3689-93.
156. Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006; 348: 1-12.
157. Dubuisson J. Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 242: 135-48.

158. Michalak JP, Wychowski C, Choukhi A, Meunier JC, Ung S, Rice CM, Dubuisson J. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 9): 2299-306.
159. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-41.
160. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21: 5017-25.
161. Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 2003; 278: 41003-12.
162. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 2003; 278: 41624-30.
163. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003; 197: 633-42.
164. Hastings JW. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene* 1996; 173: 5-11.
165. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11: 791-6.
166. Bradley D, McCaustland K, Krawczynski K, Spelbring J, Humphrey C, Cook EH. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol* 1991; 34: 206-8.
167. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12766-71.

168. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 1992; 181: 293-300.
169. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 2006; 80: 2418-28.
170. Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S, Galli-Stampino L, Colombatto P, Brunetto M, Yen TS, Houghton M, Pileri P, Abrignani S. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2834-42.
171. Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, Faure G, Crainic R, Budkowska A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 2001; 75: 8240-50.
172. Deforges S, Evlashev A, Perret M, Sodoyer M, Pouzol S, Scoazec JY, Bonnaud B, Diaz O, Paranhos-Baccala G, Lotteau V, Andre P. Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol* 2004; 85: 2515-23.
173. Diaz O, Delers F, Maynard M, Demignot S, Zoulim F, Chambaz J, Trepo C, Lotteau V, Andre P. Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J Gen Virol* 2006; 87: 2983-91.
174. Okochi H, Mine T, Nashiro K, Suzuki J, Fujita T, Furue M. Expression of tetraspans transmembrane family in the epithelium of the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* 1999; 29: 63-7.
175. Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Giorgi M, Morrica A, Pistello M, Cammarota G, Marchi S, Ciccorossi P, Bionda A, Bendinelli M. Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 7): 1521-5.
176. Muller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 4): 669-76.
177. Pachiadakis I, Pollara G, Chain BM, Naoumov NV. Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 296-304.

178. Agnello V, Abel G. Localization of hepatitis C virus in cutaneous vasculitic lesions in patients with type II cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2007-15.
179. Beach MJ, Meeks EL, Mimms LT, Vallari D, DuCharme L, Spelbring J, Taskar S, Schleicher JB, Krawczynski K, Bradley DW. Temporal relationships of hepatitis C virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzees. *J Med Virol* 1992; 36: 226-37.
180. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3805-9.
181. Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, Gardner JP, Dragic T. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14067-72.
182. Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 4498-503.
183. Cambi A, Koopman M, Figdor CG. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol* 2005; 7: 481-8.
184. van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 697-709.
185. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix dL, Staropoli I, Foung S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003; 278: 20358-66.
186. Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Cosset FL, Altmeyer R. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 2004; 279: 32035-45.
187. Saunier B, Triyatni M, Ulianich L, Maruvada P, Yen P, Kohn LD. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol* 2003; 77: 546-59.

188. Barth H, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B, Cosset FL, Patel AH, Blum HE, Baumert TF. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 2006; 80: 10579-90.
189. Basu A, Kanda T, Beyene A, Saito K, Meyer K, Ray R. Sulfated homologues of heparin inhibit hepatitis C virus entry into mammalian cells. *J Virol* 2007; 81: 3933-41.
190. Callens N, Ciczora Y, Bartosch B, Vu-Dac N, Cosset FL, Pawlotsky JM, Penin F, Dubuisson J. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* 2005; 79: 15331-41.
191. Andreo U, Maillard P, Kalinina O, Walic M, Meurs E, Martinot M, Marcellin P, Budkowska A. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol* 2007; 9: 2445-56.
192. Rudenko G, Deisenhofer J. The low-density lipoprotein receptor: ligands, debates and lore. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13: 683-9.
193. Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Brechot C, Paranhos-Baccala G, Lotteau V. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 2002; 76: 6919-28.
194. Petit JM, Minello A, Duvillard L, Jooste V, Monier S, Texier V, Bour JB, Poussier A, Gambert P, Verges B, Hillon P. Cell surface expression of LDL receptor in chronic hepatitis C: correlation with viral load. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E416-E420.
195. Nakamuta M, Fujino T, Yada R, Aoyagi Y, Yasutake K, Kohjima M, Fukuizumi K, Yoshimoto T, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Taketomi A, Maehara Y, Nakashima M, Enjoji M. Expression profiles of genes associated with viral entry in HCV-infected human liver. *J Med Virol* 2011; 83: 921-7.
196. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 472-84.
197. Meunier JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH, Bukh J. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4560-5.

198. Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 2007; 81: 13783-93.
199. Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 397-422.
200. Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 136-48.
201. Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 7270-4.
202. McKeating JA, Zhang LQ, Logvinoff C, Flint M, Zhang J, Yu J, Butera D, Ho DD, Dustin LB, Rice CM, Balfe P. Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol* 2004; 78: 8496-505.
203. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309: 623-6.
204. Flint M, von Hahn T, Zhang J, Farquhar M, Jones CT, Balfe P, Rice CM, McKeating JA. Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* 2006; 80: 11331-42.
205. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009; 457: 882-6.
206. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006; 80: 5308-20.
207. Zhong J, Gastaminza P, Chung J, Stamataki Z, Isogawa M, Cheng G, McKeating JA, Chisari FV. Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *J Virol* 2006; 80: 11082-93.
208. Schaller T, Appel N, Koutsoudakis G, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R. Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J Virol* 2007; 81: 4591-603.

209. Wang L, Boyer JL. The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology* 2004; 39: 892-9.
210. Mensa L, Crespo G, Gastinger MJ, Kabat J, Perez-del-Pulgar S, Miquel R, Emerson SU, Purcell RH, Forns X. Hepatitis C virus receptors claudin-1 and occludin after liver transplantation and influence on early viral kinetics. *Hepatology* 2011; 53: 1436-45.
211. Reynolds GM, Harris HJ, Jennings A, Hu K, Grove J, Lalor PF, Adams DH, Balfe P, Hubscher SG, McKeating JA. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* 2008; 47: 418-27.
212. Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Weiner A, Zhu Q, Pizza M, Crotta S. CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* 2008; 82: 8316-29.
213. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002; 195: 35-41.
214. Wack A, Soldaini E, Tseng C, Nuti S, Klimpel G, Abrignani S. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 166-75.
215. Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 2001; 108: 793-7.
216. Bartosch B, Bukh J, Meunier JC, Granier C, Engle RE, Blackwelder WC, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14199-204.
217. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaek D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 2007; 46: 1722-31.
218. Bartosch B, Verney G, Dreux M, Donot P, Morice Y, Penin F, Pawlotsky JM, Lavillette D, Cosset FL. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C

virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* 2005; 79: 8217-29.

219. Dreux M, Pietschmann T, Granier C, Voisset C, Ricard-Blum S, Mangeot PE, Keck Z, Fong S, Vu-Dac N, Dubuisson J, Bartenschlager R, Lavillette D, Cosset FL. High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 2006; 281: 18285-95.

220. Maillard P, Huby T, Andreo U, Moreau M, Chapman J, Budkowska A. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Clal is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J* 2006; 20: 735-7.

221. von Hahn T, Lindenbach BD, Boullier A, Quehenberger O, Paulson M, Rice CM, McKeating JA. Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology* 2006; 43: 932-42.

222. Kapadia SB, Barth H, Baumert T, McKeating JA, Chisari FV. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol* 2007; 81: 374-83.

223. Yalaoui S, Huby T, Franetich JF, Gego A, Rametti A, Moreau M, Collet X, Siau A, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Luty AJ, Vaillant JC, Hannoun L, Chapman J, Mazier D, Froissard P. Scavenger receptor BI boosts hepatocyte permissiveness to Plasmodium infection. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 283-92.

224. Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 121-42.

225. Schulzke JD, Fromm M. Tight junctions: molecular structure meets function. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 1-6.

226. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-88.

227. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 511-6.

228. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005; 171: 939-45.
229. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142: 117-27.
230. Visser J, Rozing J, Sapone A, Lammers K, Fasano A. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 195-205.
231. Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 113-20.
232. Tsukita S, Katsuno T, Yamazaki Y, Umeda K, Tamura A, Tsukita S. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 44-52.
233. Michels C, Aghdam SY, Niessen CM. Cadherin-mediated regulation of tight junctions in stratifying epithelia. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 163-8.
234. Van Itallie CM, Anderson JM. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19: 331-8.
235. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-50.
236. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002; 156: 1099-111.
237. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 1386-90.

238. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 6281-7.
239. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 2004; 164: 1627-33.
240. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res* 2001; 61: 7878-81.
241. Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. *Gastroenterology* 2001; 121: 678-84.
242. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alo PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2567-75.
243. Higashi Y, Suzuki S, Sakaguchi T, Nakamura T, Baba S, Reinecker HC, Nakamura S, Konno H. Loss of claudin-1 expression correlates with malignancy of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res* 2007; 139: 68-76.
244. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005; 18: 511-8.
245. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 403-29.
246. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007; 446: 801-5.
247. Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, Thumann C, Harris HJ, Schnober EK, Mee C, Soulier E, Royer C, Lambotin M, Grunert F, Dao T, V, Dreux M, Cosset FL, McKeating JA, Schuster C, Baumert TF. Inhibition of hepatitis C virus infection by

anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 2010; 51: 1144-57.

248. Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, Hu K, Yuan F, Deng H, Hubscher SG, Han JH, Balfe P, McKeating JA. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 2008; 82: 5007-20.

249. Cukierman L, Meertens L, Bertaux C, Kajumo F, Dragic T. Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts. *J Virol* 2009; 83: 5477-84.

250. Yang W, Qiu C, Biswas N, Jin J, Watkins SC, Montelaro RC, Coyne CB, Wang T. Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2008; 283: 8643-53.

251. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 2009; 83: 2011-4.

252. Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, Song X, Ding M, Deng H. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 2007; 81: 12465-71.

253. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 2008; 82: 3555-60.

254. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 2006; 6: 186.

255. Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, Bose R, Liu Z, Donovan RS, Shinjo F, Liu Y, Dembowy J, Taylor IW, Luga V, Przulj N, Robinson M, Suzuki H, Hayashizaki Y, Jurisica I, Wrana JL. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 2005; 307: 1621-5.

256. Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT, Schoggins JW, Catanese MT, Burton DR, Law M, Rice CM, Ploss A. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 2011; 474: 208-11.

257. Ciesek S, Steinmann E, Iken M, Ott M, Helfritz FA, Wappler I, Manns MP, Wedemeyer H, Pietschmann T. Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010; 138: 1875-84.

258. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2006; 80: 6964-72.
259. Lavillette D, Bartosch B, Nourrisson D, Verney G, Cosset FL, Penin F, Pecheur EI. Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* 2006; 281: 3909-17.
260. Coller KE, Berger KL, Heaton NS, Cooper JD, Yoon R, Randall G. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000702.
261. Farquhar MJ, Harris HJ, Diskar M, Jones S, Mee CJ, Nielsen SU, Brimacombe CL, Molina S, Toms GL, Maurel P, Howl J, Herberg FW, van Ijzendoorn SC, Balfe P, McKeating JA. Protein kinase A-dependent step(s) in hepatitis C virus entry and infectivity. *J Virol* 2008; 82: 8797-811.
262. Muniz M, Alonso M, Hidalgo J, Velasco A. A regulatory role for cAMP-dependent protein kinase in protein traffic along the exocytic route. *J Biol Chem* 1996; 271: 30935-41.
263. Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A, Desombere I, Roels GL, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 2008; 47: 17-24.
264. Schwarz AK, Grove J, Hu K, Mee CJ, Balfe P, McKeating JA. Hepatoma cell density promotes claudin-1 and scavenger receptor BI expression and hepatitis C virus internalization. *J Virol* 2009; 83: 12407-14.
265. Witteveldt J, Evans MJ, Bitzegeio J, Koutsoudakis G, Owsianka AM, Angus AG, Keck ZY, Fong SK, Pietschmann T, Rice CM, Patel AH. CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* 2009; 90: 48-58.
266. Tector AJ, Mangus RS, Chestovich P, Vianna R, Fridell JA, Milgrom ML, Sanders C, Kwo PY. Use of extended criteria livers decreases wait time for liver transplantation without adversely impacting posttransplant survival. *Ann Surg* 2006; 244: 439-50.
267. Vitale A, D'Amico F, Brolese A, Zanus G, Boccagni P, Neri D, Gringeri E, Valmasoni M, Ciarleglio FA, Carraro A, Pauletto A, Bonsignore P, Bassi D, Polacco M,

- D'Amico DF, Cillo U. Prognostic impact of model for end-stage liver disease score in patients undergoing liver transplantation with suboptimal livers. *Transplant Proc* 2007; 39: 1907-9.
268. Avolio AW, Nardo B, Agnes S, Montalti R, Pepe G, Cavallari A, Castagneto M. The mismatch choice in liver transplantation: a suggestion for the selection of the recipient in relation to the characteristics of the donor. *Transplant Proc* 2005; 37: 2584-6.
269. Silberhumer GR, Pokorny H, Hetz H, Herkner H, Rasoul-Rockenschaub S, Soliman T, Wekerle T, Berlakovich GA, Steininger R, Muehlbacher F. Combination of extended donor criteria and changes in the Model for End-Stage Liver Disease score predict patient survival and primary dysfunction in liver transplantation: a retrospective analysis. *Transplantation* 2007; 83: 588-92.
270. Amin MG, Wolf MP, TenBrook JA, Jr., Freeman RB, Jr., Cheng SJ, Pratt DS, Wong JB. Expanded criteria donor grafts for deceased donor liver transplantation under the MELD system: a decision analysis. *Liver Transpl* 2004; 10: 1468-75.
271. Foster R, Zimmerman M, Trotter JF. Expanding donor options: marginal, living, and split donors. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 417-29.
272. Yagci G, Fernandez LA, Knechtle SJ, D'Alessandro AM, Chin LT, Musat AI, Lucey MR, Said A, Pirsch JD, Levenson G, Kalayoglu M. The impact of donor variables on the outcome of orthotopic liver transplantation for hepatitis C. *Transplant Proc* 2008; 40: 219-23.
273. Samuel D, Forns X, Berenguer M, Trautwein C, Burroughs A, Rizzetto M, Trepo C. Report of the monothematic EASL conference on liver transplantation for viral hepatitis (Paris, France, January 12-14, 2006). *J Hepatol* 2006; 45: 127-43.
274. Khapra AP, Agarwal K, Fiel MI, Kontorinis N, Hossain S, Emre S, Schiano TD. Impact of donor age on survival and fibrosis progression in patients with hepatitis C undergoing liver transplantation using HCV+ allografts. *Liver Transpl* 2006; 12: 1496-503.
275. Friedman EA, Shyh TP, Beyer MM, Manis T, Butt KM. Posttransplant diabetes in kidney transplant recipients. *Am J Nephrol* 1985; 5: 196-202.

276. Krentz AJ, Dousset B, Mayer D, McMaster P, Buckels J, Cramb R, Smith JM, Natrass M. Metabolic effects of cyclosporin A and FK 506 in liver transplant recipients. *Diabetes* 1993; 42: 1753-9.
277. O'Grady JG, Burroughs A, Hardy P, Elbourne D, Truesdale A. Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 1119-25.
278. Cosio FG, Pesavento TE, Osei K, Henry ML, Ferguson RM. Post-transplant diabetes mellitus: increasing incidence in renal allograft recipients transplanted in recent years. *Kidney Int* 2001; 59: 732-7.
279. Nemes B. A magyar májátültetési program eredményeit befolyásoló egyes tényezők, különös tekintettel a hepatitis C vírusra. 22-34. 2006.
280. D'Souza R, Sabin CA, Foster GR. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1509-15.
281. Tai TY, Lu JY, Chen CL, Lai MY, Chen PJ, Kao JH, Lee CZ, Lee HS, Chuang LM, Jeng YM. Interferon-alpha reduces insulin resistance and beta-cell secretion in responders among patients with chronic hepatitis B and C. *J Endocrinol* 2003; 178: 457-65.
282. Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, Itou M, Sumie S, Nagao Y, Yanagimoto C, Hanada S, Koga H, Sata M. Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 570-6.
283. Baid S, Cosimi AB, Farrell ML, Schoenfeld DA, Feng S, Chung RT, Tolkoﬀ-Rubin N, Pascual M. Posttransplant diabetes mellitus in liver transplant recipients: risk factors, temporal relationship with hepatitis C virus allograft hepatitis, and impact on mortality. *Transplantation* 2001; 72: 1066-72.
284. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, Maertens G, Williams R. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334: 815-20.
285. Bizollon T, Pradat P, Mabrut JY, Chevallier M, Adham M, Radenne S, Souquet JC, Ducerf C, Baulieux J, Zoulim F, Trepo C. Benefit of sustained virological response

to combination therapy on graft survival of liver transplanted patients with recurrent chronic hepatitis C. *Am J Transplant* 2005; 5: 1909-13.

286. Kronenberger B, Ruster B, Elez R, Weber S, Piiper A, Lee JH, Roth WK, Zeuzem S. Interferon alfa down-regulates CD81 in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33: 1518-26.

287. Murao K, Imachi H, Yu X, Cao WM, Nishiuchi T, Chen K, Li J, Ahmed RA, Wong NC, Ishida T. Interferon alpha decreases expression of human scavenger receptor class BI, a possible HCV receptor in hepatocytes. *Gut* 2008; 57: 664-71.

288. Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, Rimola A, Rodes J. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680-7.

289. Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, Tam W. MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 183-94.

290. Morita K, Taketomi A, Shirabe K, Umeda K, Kayashima H, Ninomiya M, Uchiyama H, Soejima Y, Maehara Y. Clinical significance and potential of hepatic microRNA-122 expression in hepatitis C. *Liver Int* 2011; 31: 474-84.

291. Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 2008; 27: 5959-74.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. Nemes B, Gelley F, Zádori G, Piros L, Pernecky J, Kóbori L, Fehérvári I, Görög D. Outcome of Liver Transplantation Based on Donor Graft Quality and Recipient Status. Transpl Proc 2010; 42: 2327-2330. IF: 0.993
2. Gelley F, Zadori G, Firneisz G, Wagner L, Fehervari I, Gerlei Z, Fazakas J, Papai S, Lengyel G, Sarvary E, Nemes B. Relationship between hepatitis C virus recurrence and de novo diabetes after liver transplantation: the Hungarian experience. Transpl Proc 2011; 43: 1281-1282. IF: 0.993
3. Zádori G, Gelley F, Törzsök P, Sárváry E, Doros A, Deák AP, Nagy P, Schaff Zs, Kiss A, Nemes B. Examination of claudin-1 expression in patients undergoing liver transplantation owing to hepatitis C virus cirrhosis. Transpl Proc 2011; 43: 1267-1271. IF: 0.993

11.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

1. Nemes B, Gelley F, Piros L, Zádori G, Görög D, Fehérvári I, Kóbori L, Sárváry E, Nagy P, Kiss A, Doros A. The impact of Milan criteria on liver transplantation for hepatocellular carcinoma: First 15 years' experience of the Hungarian Liver Transplant Program. Transpl Proc 2011; 43: 1272-1274. IF: 0.993
2. Nemes B, Zadori G, Gorog D, Fehervari I, Kobori L, Langer RM. Liver transplantation for acute liver failure: the Hungarian experience. Transpl Proc. 2011; 43: 1278-1280. IF: 0.993
3. Gelley F, Doros A, Micsik T, Fazakas J, Fehérvári I, Zádori G, Müller Zs, Gelley A, Nemes B. Acute liver transplantation in a 41-year-old male patient presenting symptoms of adult-onset Still's disease. IMAS 2011; 3: 9-13.

4. Nemes B, Gelley F, Zádori G, Földesi K, Firneisz G, Görög D, Fehérvári I, Kóbori L, Gerlei Zs, Fazakas J, Pápai S, Doros A, Nagy P, Lengyel G, Schaff Zs, Sárváry E. De novo diabetes és májátültetés, különös tekintettel a hepatitis C-vírus kiújulására. Orv Hetil 2010; 151: 1062-1071.
5. Nemes B, Zádori G, Gelley F, Gaman G, Gorog D, Doros A, Sarvary E. Can a Cutoff Value for Cystatin C in the Operative Setting Be Determined to Predict Kidney Function After Liver Transplantation? Transpl Proc 2010; 42: 2323-2326. IF: 0.993
6. Nemes B, Gelley F, Zádori G, Görög D, Fehérvári I, Jakab K, Fazakas J, Mándli T, Gerlei Z, Sárváry E, Doros A, Kóbori L. Marginális donorok szerepe a magyar májátültetési programban. Orv Hetil 2009; 150: 2228-2236.
7. Nemes B, Zádori G, Hartmann E, Németh A, Fehérvári I, Görög D, Máthé Z, Dávid A, Jakab K, Sárváry E, Piros L, Tóth Sz, Fazakas J, Gerlei Zs, Járay J, Doros A. Epeúti szövődmények májtranszplantáció után. Orv Hetil 2008; 149: 963-973.

12. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani mentoromnak, **dr. Nemes Balázsnak**, hogy diákkoromban felkarolt, támogatott, elindított az orvosi pályámon és lehetőséget adott PhD tanulmányaim elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom a SE Transzplantációs és Sebészeti Klinika igazgatójának, a „kísérletes és klinikai transzplantáció” PhD program vezetőjének, **prof. Dr. Langer Róbertnek** a munkámhoz szükséges háttér biztosításához.

Köszönetet szeretnék mondani **dr. Kiss Andrásnak**, aki biztosította számomra a II.sz. Patológiai Intézetben a kutatáshoz szükséges labor háttérrel, emellett számtalan tanácsával elengedhetetlen segítséget nyújtott a kísérletek kivitelezésében és kiértékelésében.

Köszönettel tartozom **dr. Gelley Fanninak**, akinek a májbiopsziák vételében nyújtott segítsége és emberi támogatása felbecsülhetetlen értékű volt számomra.

Köszönetet szeretnék mondani **dr. Sárváry Enikőnek** és **dr. Varga Marinának**, akik biztosítják számomra a SE Transzplantációs és Sebészeti Klinikán a mintáim tárolását, emellett dr. Sárváry Enikő HCV kópia szám mérései elengedhetetlenek voltak a munkámhoz.

Köszönettel tartozom a SE Transzplantációs és Sebészeti Klinika sebészeinek (**dr. Dallos Gábor, dr. Fehérvári Imre, dr. Görög Dénes, dr. Hamar Mátyás, dr. Kóbori László, dr. Lázár Norbert, dr. Máthé Zsolt, dr. Péter Antal, dr. Piros László, dr. Pócze Balázs, dr. Telkes Gábor, dr. Toronyi Éva, dr. Végső Gyula**), és koordinátorainak (**Balogh Andrea, Borsodi Etelka, Mező Anikó**) a donormájakból történt biopsziák vételében nyújtott segítségéért, a Klinika radiológusainak (**dr. Doros Attila, dr. Deák Pál Ákos, dr. Hartmann Erika, dr. Kozma Veronika, dr. Németh Andrea**) a májátültetés után történt májbiopsziák elvégzéséért, **dr. Gerlei Zsuzsannának**, hogy biztosította a májambulancián gondozott betegek klinikai adataihoz történő hozzáférést.

Köszönetemet szeretném kifejezni **dr. Lotz Gábornak** az immunhisztokémiai mérésekben nyújtott segítségéért, valamint **Pekár Magdolnának** és **Gregor Viktóriának** az immunhisztokémiai reakciók kivitelezéséért.

Köszönettel tartozom **Balogh Andreának, Gámán Györgynek, Pápai Simonnak, Perneczky Júliának**, valamint **Szanyi Szilárdnak** a betegek klinikai adatainak gyűjtésében nyújtott segítségéért.

Végül köszönettel tartozom drága **feleségemnek** az örökös biztatásáért, támogatásáért, ezek nélkül PhD tanulmányaimat nem tudtam volna befejezni.