

# Povezanost deplecije limfocita i trombocita nakon indukcijske terapije Thymoglobulinom s razvojem vaskulopatije presatka nakon transplantacije srca

---

Doronjga, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:281894>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-04**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Marija Doronjga**

**Povezanost deplecije limfocita i trombocita nakon indukcijske terapije  
Thymoglobulinom s razvojem vaskulopatije presatka nakon transplantacije  
srca**

**Diplomski rad**



**Zagreb, 2024.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za bolesti srca i krvnih žila Kliničkog bolničkog centra Zagreb, na Zavodu za intenzivnu kardiološku skrb, aritmije i transplantacijsku kardiologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Boška Skorića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

Mentor: prof. dr. sc. Boško Skorić

## Popis kratica

**ACEI** – Inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *Angiotensin-converting enzyme inhibitors*)

**AMR** – Odbacivanje posredovano protutijelima (engl. *antibody-mediated rejection*)

**ALC** – Apsolutni broj limfocita (engl. *absolute lymphocyte count*)

**APC** – Antigen prezentirajuće stanice (engl. *antigen presenting cells*)

**ASK** – Acetilsalicilna kiselina (engl. *acetylsalicylic acid*)

**CAV** – Vaskulopatija srčanog presatka (engl. *cardiac allograft vasculopathy*)

**CI** – Interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

**CMV** – Citomegalovirus (engl. *cytomegalovirus*)

**CNI** – Inhibitori kalcineurina (engl. *calcineurin inhibitors*)

**DCB** – Lijekom obloženi balon (engl. *drug coated balloon*)

**DSA** – Donor specifična protutijela (engl. *donor specific antibodies*)

**eGFR** – Procijenjena glomerularna filtracija (engl. *estimated glomerular filtration rate*)

**HbA1c** – Glikirani hemoglobin (engl. *glycated hemoglobin*)

**HDL-C** – Lipoprotein visoke gustoće kolesterol (engl. *high-density lipoprotein cholesterol*)

**HLA** – Humani leukocitni antigeni (engl. *human leukocyte antigen*)

**HR** – Omjer hazarda (engl. *hazard ratio*)

**HTx** – Transplantacija srca (engl. *heart transplantation*)

**ISHLT** – Međunarodno društvo za transplantaciju srca i pluća (engl. *International Society for Heart and Lung Transplantation*)

**ITM** – Indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

**IFN- $\gamma$**  – Interferon gama (engl. *interferon gamma*)

**IVUS** – Intravaskularni ultrazvuk (engl. *intravascular ultrasound*)

**IQR** – Interkvartilni raspon (engl. *interquartile range*)

**LDA** – Protutijela koja smanjuju broj limfocita (engl. *lymphocyte-depleting antibodies*, LDAs)

**LDL-C** – Lipoprotein niske gustoće kolesterol (engl. *low-density lipoprotein cholesterol*)

**MFK** – Mikofenolna kiselina (engl. *mycophenolic acid*)

**MIT** – Minimalna debljina intime (engl. *minimal intimal thickness*)

**MHC** – Glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

**MMF** – Mikofenolat mofetil (engl. *mycophenolate mofetil*)

**mTORi** – mTOR inhibitori (engl. *mammalian target of rapamycin inhibitors*)

**NKC** – Stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*)

**NT-proBNP** – N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptida (engl. *N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide*)

**OCT** – Optička koherentna tomografija (engl. *optical coherence tomography*)

**OR** – Omjer izgleda (engl. *odds ratio*)

**PCI** – Perkutana koronarna intervencija (engl. *percutaneous coronary intervention*)

**PRA** – Panel reaktivna protutijela (engl. *panel reactive antibodies*)

**PDGF** – Faktor rasta deriviran iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*)

**rATG** – Kunićji antitimocitni globulin (engl. *rabbit antitymocyte globuline*)

**RR** – Relativni rizik (engl. *relative risk*)

**TGF- $\beta$**  – Transformirajući faktor rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

## **Sadržaj**

### **Sažetak**

### **Summary**

1. Uvod
  - 1.1. Vaskulopatija srčanog presatka
  - 1.2. Etiologija vaskulopatije srčanog presatka
  - 1.3. Uloga limfocita u nastanku vaskulopatije srčanog presatka
  - 1.4. Uloga trombocita u nastanku vaskulopatije srčanog presatka
  - 1.5. Patohistološke promjene u vaskulopatiji srčanog presatka
  - 1.6. Klinička prezentacija vaskulopatije srčanog presatka
  - 1.7. Lijekovi za prevenciju vaskulopatije srčanog presatka
    - 1.7.1. Statini
    - 1.7.2. Mikofenolat mofetil
    - 1.7.3. mTOR inhibitori
    - 1.7.4. Acetilsalicilna kiselina (ASK)
    - 1.7.5. Indukcijska terapija kunićjim antitimocitnim globulinom (rATG, Thymoglobulin)
2. Hipoteza
3. Ciljevi rada
4. Ispitanici i metode
  - 4.1. Ispitanici i metode
  - 4.2. Statistička obrada
5. Rezultati
6. Rasprava
7. Zaključak
8. Zahvale
9. Literatura
10. Životopis

## Sažetak

### Povezanost deplecije limfocita i trombocita nakon indukcijske terapije Thymoglobulinom s razvojem vaskulopatije presatka nakon transplantacije srca

Marija Doronjga

**Uvod:** Vaskulopatija srčanog presatka (engl. *cardiac allograft vasculopathy*, CAV) je jedan od glavnih uzroka posttransplantacijskog morbiditeta i mortaliteta. Premda je imunološki-posredovano oštećenje ključno i specifično za nastanak CAV-a, korist od snažne indukcijske imunosupresije kunićjim antitimocitnim globulinom (rATG, *Thymoglobulin*) u prevenciji CAV-a nakon transplantacije srca (HTx) ostaje kontroverzna i slabo istražena. Dok limfopeniju smatramo odrazom terapijskog učinka, popratni pad broja trombocita u perifernoj krvi nakon primjene rATG-a držimo neželjenom nuspojavom iako postoje pokazatelji da upravo trombociti igraju ulogu u patogenezi CAV-a.

Hipoteza ovog istraživanja je da bolesnici nakon HTx i indukcije rATG-om sa snažnijim padom limfocita i trombocita imaju nižu incidenciju vaskulopatije presatka tijekom trogodišnjeg praćenja.

**Metode:** U ovu retrospektivnu studiju uključili smo 94 bolesnika kojima je učinjena HTx u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u razdoblju od siječnja 2010. do prosinca 2017. godine. Svi bolesnici su primili indukcijsku terapiju rATG-om tijekom 5 dana nakon HTx u dnevnoj dozi od 1,5 mg/kg. Svim bolesnicima smo određivali kompletnu krvnu sliku s diferencijalnim brojem leukocita 0. dan, te 7., 14. i 21. poslijetransplantacijski dan. Primarni ishod bila je dijagnoza CAV stupnja  $\geq 1$  tijekom 3 godine nakon HTx.

**Rezultati:** Tijekom perioda praćenja 26,6% bolesnika je razvilo CAV. Ovi bolesnici su imali značajno starije darivatelje (47 (IQR 40-49) naspram 37 (IQR 28-49) godina;  $p=0,02$ ), veći broj trombocita 7. dan ( $140 \times 10^9/L$  (IQR 103-156  $\times 10^9/L$ ) naspram  $105 \times 10^9/L$  (IQR 68-147  $\times 10^9/L$ );  $p=0,04$ ), veći apsolutni broj limfocita 14. dan ( $335 \times 10^9/L$  (IQR 184-314  $\times 10^9/L$ ) naspram  $215 \times 10^9/L$  (IQR 105-401  $\times 10^9/L$ );  $p=0,02$ ) i veći broj trombocita 21. dan nakon transplantacije ( $237 \times 10^9/L$  (IQR 195-278  $\times 10^9/L$ ) naspram  $193 \times 10^9/L$  (IQR 148-226  $\times 10^9/L$ );  $p=0,03$ ). Univarijatna binarna logistička regresija pokazala je povezanost CAV-a sa starijom dobi darivatelja, apsolutnim brojem limfocita  $\geq 200 \times 10^9/L$  7. dana i većim brojem trombocita 7. i 21. dan nakon HTx. U multivarijabilnoj binarnoj logističkoj regresiji, prilagođeni rizik od CAV-a ostao je značajan za bolesnike koji su imali starijeg darivatelja ( $p=0,027$ ) i veći broj trombocita 21. dan ( $p=0,04$ ).

**Zaključak:** Niži broj trombocita nakon indukcije rATG-om je povezan s manjom incidencijom CAV-a tijekom 3 godine nakon HTx. Varijabilni odgovor trombocita na primjenu rATG mogao bi objasniti proturiječne rezultate dosadašnjih studija na način da korist od rATG-a u prevenciji CAV-a imaju upravo oni bolesnici koji na ovaj lijek reagiraju većim padom broja trombocita.

**Ključne riječi:** kunićji antitimocitni globulin, vaskulopatija srčanog presatka, transplantacija srca



## Summary

### Association of lymphocyte and platelet depletion after Thymoglobulin induction therapy with the development of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation

Marija Doronjga

**Background:** Cardiac allograft vasculopathy (CAV) is one of the main causes of morbidity and mortality after heart transplantation (HTx). Although immune-mediated mechanisms are pivotal and specific for the development of CAV, the benefit of intense induction immunosuppression with rabbit antithymocyte globulin (rATG, *Thymoglobulin*) in the prevention of CAV after HTx remains controversial and understudied. While lymphopenia is considered a therapeutic effect, the accompanying drop in the number of platelets in the peripheral blood after the administration of rATG is considered an unwanted side effect, even though there are reasonable implications that platelets could play a role in the pathogenesis of CAV.

This study hypothesizes that patients with a stronger decrease in lymphocyte and platelet count after rATG induction have a lower incidence of CAV during the 3-year follow-up.

**Methods:** In this retrospective study, we included 94 patients receiving heart transplantation between January 2010 and December 2017. All patients received rATG induction therapy for 5 days after HTx at a daily dose of 1.5 mg/kg. Absolute lymphocyte count (ALC) and platelet counts were assessed on days 0, 7, 14, and 21 following HTx. The primary outcome was the diagnosis of grade  $\geq 1$  CAV during 3 years of follow-up.

**Results:** During the follow-up period, 26.6% of patients developed CAV. These patients had significantly older donors (47 (IQR 40-49) vs 37 (IQR 28-49) years;  $p=0.02$ ), higher platelet count on day 7 ( $140 \times 10^9/L$  (IQR 103-156  $\times 10^9/L$ ) vs  $105 \times 10^9/L$  (IQR 68-147  $\times 10^9/L$ );  $p=0.04$ ), higher ALC on day 14 ( $335 \times 10^9/L$  (IQR 184-314  $\times 10^9/L$ ) vs  $215 \times 10^9/L$  (IQR 105-401  $\times 10^9/L$ );  $p=0.02$ ), and higher platelet count on day 21 post-HTx ( $237 \times 10^9/L$  (IQR 195-278  $\times 10^9/L$ ) vs  $193 \times 10^9/L$  (IQR 148-226  $\times 10^9/L$ );  $p=0.03$ ). Univariate binary logistic regression showed that CAV was associated with older donor age,  $ALC \geq 200 \times 10^9/L$  on day 7, and higher platelet count on days 7 and 21. In multivariable binary logistic regression, the adjusted risk of CAV remained significant for patients with older donors ( $p=0.027$ ) and higher platelet count on day 21 ( $p=0.04$ ).

**Conclusion:** Lower platelet count after rATG induction was associated with a lower incidence of CAV during the first 3 years after HTx. The inconsistent findings of earlier research examining the impact of rATG induction in CAV prevention may be explained by the varying platelet response to rATG, with recipients exhibiting a stronger decrease in platelet count benefiting from the treatment.

**Keywords:** cardiac allograft vasculopathy, *rabbit antithymocyte globulin*, heart transplantation

## 1. Uvod

### 1.1. Vaskulopatija srčanog presatka

Vaskulopatija srčanog presatka (engl. *cardiac allograft vasculopathy*, CAV) je jedan od glavnih uzroka posttransplantacijskog mortaliteta. Prevalencija CAV-a raste s vremenom nakon transplantacije (30%-45% nakon 5 godina, 50%-65% nakon 10 godina) (1).

CAV se trenutno klasificira prema kriterijima Međunarodnog društva za transplantaciju srca i pluća (engl. *International Society of Heart and Lung Transplantation*, ISHLT) (2) koji se baziraju na nalazu koronarografije i prisutstvu disfunkcije presatka, tj. smanjene ejekcijske frakcije lijeve klijetke i/ili restriktivnog poremećaja dijasboličke funkcije (Slika 1). Prema ovoj klasifikaciji stupnjevi CAV-a su: blagi (CAV 1), umjereni (CAV 2) i teški (CAV 3). CAV 0 označava odsustvo promjena na koronarografiji. Pokazalo se da je ova ISHLT klasifikacija povezana s dugoročnim preživljenjem.

Najuvrješeneje mišljenje je da je CAV rezultat multifaktorijalnih zbivanja koja uzrokuju upalni odgovor, dok se razvoj i napredovanje CAV-a pripisuju endotelnoj disfunkciji, staničnoj infiltraciji i širokom rasponu predisponirajućih čimbenika i čimbenika bolesnika.

Morfološki, CAV karakterizira progresivno, difuzno intimalno zadebljanje, te koncentrično i longitudinalno suženje lumena velikih i malih epikardnih i intramiokardnih koronarnih arterija, ali i vena (3,4).

CAV uzrokuje poremećaj protoka krvi u koronarnoj cirkulaciji presatka dovodeći do slabljenja njegove funkcije.

Temelj dijagnostike CAV je koronarna angiografija, udružena s ehokardiografskom procjenom funkcije presatka, a ponekad i kateterizacijom srca. Nedostatak koronarografije je mala osjetljivost. Ona ne može procijeniti niti početne promjene koje nastaju u stijenkama velikih krvnih žila, niti patološke promjene mikrovaskulature. Promjene u mikrovaskulaturi povezane su s neželjnim događajima neovisno o stanju epikardijalnih žila (2,5). Uvođenje metoda intravaskularnog oslikavanja poput intravaskularnog ultrazvuka (engl. *intravascular ultrasound*, IVUS) i optičke koherentne tomografije (OCT) je dovelo do boljeg razumijevanja evolucije CAV-a i spoznaje da se CAV može razviti rano u posttransplantacijskom periodu (6). Navedene metode mogu poslužiti u praćenju progresije intimalnog zadebljanja tijekom

prve poslijetransplantacijske godine, što korelira s kasnijim nastankom CAV-a vidljivog na koronarografiji, odnosno s prognozom ovih bolesnika (7–12). Detekcija fibroznog plaka na OCT-u je nezavisni prediktor progresije CAV (13).

CAV koji se dijagnosticira na koronarografiji se obično razvija tijekom nekoliko godina i povezan je s odbacivanjem presatka (3,14). Tremblay-Gravel i sur. (14) analizirali su skoro 300 transplantiranih bolesnika tijekom 30 godina. Ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine prema periodu u kojem je učinjena transplantacija (rana od 1983. do 1998. i recentna od 1999. do 2011. godine), te prema stupnju CAV-a (CAV 0, 1, 2 ili 3). CAV je bio detektiran koronarografijom. Autori su uočili značajno smanjenje progresije CAV tijekom 30 godina u recentnoj kohorti u usporedbi sa starijom kohortom. Ovu razliku osim veće uporabe suvremene imunosupresivne terapije, mikofenolne kiseline i takrolimusa, također pripisuju povećanoj uporabi statina u novijoj eri. Autori su zaključili da dijagnoza CAV-a u novije doba, osobito nižih stupnjeva, nosi manje pogubnu prognozu, unatoč promjenama u demografiji darivatelja i primatelja. Međutim, nisu našli razliku u udjelu bolesnika s umjerenom (CAV 2) i teškom bolesti (CAV 3) između dvaju vremenskih perioda (17% i 20%). Veći stupanj CAV-a je korelirao s lošijom prognozom (15).

Jednom kada CAV progredira, njegovo liječenje je ograničeno. Stoga su izrazito važne strategije prevencije i rane detekcije CAV. Trenutne strategije usmjerene su na modifikaciju čimbenika rizika, uvođenje statina, prilagodbu imunosupresivnih lijekova i liječenje pogodnih vaskularnih lezija. Obzirom na difuznu prirodu, CAV se najčešće ne uspijeva liječiti perkutanom koronarnim intervencijama (PCI) ili kardiokirurškom revaskularizacijom. PCI se u pravilu rabi u slučaju fokalne bolesti (2), unatoč manjku dokaza o koristi revaskularizacije u smislu preživljavanja naspram optimalne medikamentne terapije (16). Podatci opservacijskih studija pokazuju manju incidenciju stent-tromboze pri korištenju lijekom-obloženih stentova u usporedbi s običnim metalnim stentovima (17). Poneki pacijenti mogu biti kandidati za PCI uz uporabu lijekom obloženih balona (engl. *drug coated balloons*, DCB) (18). Na kraju, retransplantacija ostaje jedina definitivna terapija za uznapredovalu CAV kod dijela ovih bolesnika (16,19). Prema aktualnom konzensusu, retransplantacija je rezervirana za uznapredovalu CAV (CAV 3) i CAV povezanu s disfunkcijom presatka (3). Za ostale skupine pacijenata, nema razlike u sveukupnom preživljenju u slučaju retransplantacije naspram medikamentne terapije (20).

Multicentrična, randomizirana, dvostruko-slijepa, placebo-kontrolirana CTOT-11 studija u nesenzitiziranih pacijenata, tj. primatelja s PRA <10% (engl. *panel reactive antibodies*, PRA) pokazala je da intenziviranje imunosupresivnog liječenja primjenom rituksimaba nulti i

dvanaesti posttransplantacijski dan ne samo da nije sprječilo nastanak, već je ubrzalo razvoj CAV-a (21).

	Lijeva glavna <sup>1</sup>	Primarne žile	Grane
CAV 0	Nema detektibilnih lezija na koronarografiji		
Blagi (CAV 1)	<50%, i/ili	1 primarna žila <70%, i/ili	Izolirana stenoza u 1 vaskularnom teritoriju <70%
Umjereni (CAV 2)	<50%, i/ili	1 primarna žila ≥70%, i/ili	Izolirana stenoza u 2 vaskularna teritorija ≥70%
Teški (CAV 3)	≥50%, i/ili	Barem 2 primarne žile ≥70%, i/ili	Izolirana stenoza u 3 vaskularna teritorija ≥70%, ili CAV 1 / 2 + LVEF ≤45%, ili restriktivni poremećaj dijasboličke funkcije (E/A>2, IVRT <60 ms, DecT <150 ms, Rap > 12 mm Hg, PCWP >25 mm Hg, CI < 2 l/min/m <sup>2</sup> )

CAV – vaskulopatija srčanog presatka; LVEF – ejectionna frakcija lijeve klijetke; IVRT – vrijeme izovolumne relaksacije; DecT – deceleracijsko vrijeme; Rap – tlak desnog atrija; PCWP - plućni kapilarni tlak; CI – srčani indeks.  
<sup>1</sup>Lijeva koronarna arterija počinje kao deblo lijeve koronarne arterije (lijeva glavna, . LM, engl. left main).  
 Preuzeto i prilagođeno prema: Velleca A, Shullo MA, Dhital K, Azeka E, Colvin M, DePasquale E i sur. The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guidelines for the care of heart transplant recipients. J Heart Lung Transplant. 2023 May;42(5):e1-e141.

**Slika 1.** Nomenklatura vaskulopatije srčanog presatka prema kriterijima Međunarodnog društva za transplantaciju srca i pluća

## 1.2. Etiologija vaskulopatije srčanog presatka

CAV je rezultat kompleksnog multifaktorijskog procesa čija etiologija nije jasna u potpunosti. Ispreplitanje niza imunoloških i neimunoloških čimbenika rizika pridonosi razvoju CAV-a uzrokujući vaskularnu upalu, endotelnu ozljedu i disfunkciju koje predstavljaju konačni zajednički put (22). Posljedice disfunkcije endotela su vazomotorna disfunkcija, tromboza, adhezija leukocita te proliferacija glatkih mišićnih stanica (16).

Većina zaključaka o patogenezi CAV je izvedena iz kliničkih opservacija. Nadalje, budući da postoji velika razlika u načinu na koji organizam glodavca i čovjeka reagiraju na alogene krvne žile, ispitivanja na životinjama predstavljaju redukcionistički model čiji se zaključci ne mogu translirati na ljude (3,23).

Poznati rizični čimbenici za razvoj CAV-a dijele se na imunološke i neimunološke. Patogeneza CAV je usko vezana uz imunološke mehanizme jer je u konačnici vaskulopatija presatka vrsta bolesti koronarne cirkulacije jedinstvena za osobe s transplantiranim srcem. Imunološki mehanizmi uključuju aktivaciju aloreaktivnih T limfocita, nastajanje specifičnih protutijela, aktivaciju makrofaga, izlučivanje faktora rasta deriviranog iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) i drugih citokina (24,25). Aktivirane endotelne stanice pokazuju pojačanu ekspresiju antigena klase I glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC), tj. humanih leukocitnih antigena (engl. *human leukocyte antigen*, HLA). Ova klasa antigena uključuje HLA-A, HLA-B i HLA-C i nalazi se na svim stanicama i prepoznaju ih CD8<sup>+</sup> T limfociti, dok se antigeni klase II, tj. HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR normalno nalaze na antigen prezentirajućim stanicama (engl. *antigen presenting cells*, APC) koje prepoznaju pomoćnički CD4<sup>+</sup> T limfociti (26). Navedene molekule dovode do aktivacije T i B limfocita.

Poznato je da su preformirana i novonastala, tj. *de novo* anti-HLA donor specifična protutijela (engl. *donor specific antibodies*, DSA) povezana s akutnim odbacivanjem presatka (engl. *antibody mediated rejection*, AMR), CAV-om i povećanom smrtnosti (27–31). Bolesnici s CAV-om često imaju DSA usmjerena na visoko polimorfne HLA-DR i HLA-DQ darivatelja, ili na manje polimorfne non-HLA MICA proteine (3). Međutim, CAV se razvija i u velikom broju bolesnika koji nemaju DSA (32). Također, do sada nema dokaza da su nastanak ili progresija CAV ublaženi ciljanim liječenjem DSA (33). Čini se da su u nastanku CAV-a posebno važna protutijela usmjerena protiv HLA klase II (31). Također, akutno stanično odbacivanje presadka u prvih 6 do 12 mjeseci nakon transplantacije je nezavisni rizični čimbenik progresije CAV (3).

Osim na HLA antigene, organizam primatelja može stvarati protutijela na tip 1 receptore za angiotenzin II i na tip A receptore za endotelin (34).

Neimunološki rizični čimbenici u nastanku CAV-a su starija dob darivatelja, ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, etiologija moždane smrti darivatelja, mlađa dob primatelja, povijest prijetransplantacijske koronarne bolesti, infekcija citomegalovirusom (CMV), arterijska hipertenzija, šećerna bolest te hiperlipidemija (3). Poznato je da je ishemijsko-reperfuzijska ozljeda presatka rizični čimbenik za razvoj CAV (35). Podatci mnogih jednocentričnih studija povezuju povećan rizik nastanka CAV uz infekciju CMV-om, no taj mehanizam je smanjen uvođenjem moderne profilakse (3,36,37).

### **1.3. Uloga limfocita u nastanku vaskulopatije srčanog presatka**

Činjenica da lezije u CAV-u prestaju na granici tkiva primatelja i darivatelja upućuje na ključnu ulogu aloimunosti u njenom nastanku. Također, nema dokaza da se CAV može razviti u situaciji bez adaptivnog imunološkog sustava (23). Najraniji koncept patogeneze CAV-a je u središte stavio ulogu stanične imunosti i to imunosti posredovane T limfocitima koji u ranoj fazi infiltriraju intimu krvnih žila i perivaskularni prostor uzrokujući upalu kao važan čimbenik inicijacije i progresije CAV-a (38). Aktivirani T limfociti izlučuju citokine (interleukin 2, -4, -5, -6, interferon- $\gamma$ ) čime regrutiraju ostale upalne stanice i aktiviraju endotel koji pojačano izražava adhezijske molekule (16). Međutim, točna uloga infiltracije T limfocitima u CAV-u nije sasvim poznata. Mnogi od tih T limfocita bi mogli biti promatrači (engl. *bystander response*), te kao takvi nemaju specifičnu ulogu samo u CAV-u, već i u većem broju proinflamatornih stanja kao što su infekcije, neoplazme, autoimune bolesti, pa čak i ateroskleroza koronarnih arterija (39).

Dva su puta aktivacije T limfocita – izravni i neizravni. Izravno prepoznavanje tkiva darivatelja presatka odgovorno je za akutno stanično odbacivanje. U neizravnom putu prepoznavanja antigena, T limfociti prepoznaju modificirane peptide derivirane od alogernih HLA molekula koje T limfocitima predstavljaju antigen prezentirajuće stanice (engl. *antigen-presenting cells*, APCs) primatelja (38). U eksperimentalnim modelima, deplecija CD4<sup>+</sup>, ali ne i deplecija CD8<sup>+</sup> T limfocita spriječila je nastanak CAV (40).

Pomoćnički CD4<sup>+</sup> T limfociti izlučuju interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) i transformirajući faktor rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Istraživanja na miševima dovela su do hipoteze da je IFN- $\gamma$  glavni pokretač patogeneze CAV (3,41,42). Sekrecija IFN- $\gamma$  i TGF- $\beta$  dovodi do aktivacije makrofaga i fibroblasta. Kontinuirana sekrecija ovih molekula održava stanje kronične upale. Osim CD4<sup>+</sup>

T limfocita, ove citokine i druge čimbenike rasta izlučuju i druge stanice poput makrofaga i stanica prirodnih ubojica (engl. *natural killer cells*, NKCs) (43). U neointimi i adventiciji koronarnih arterija kod bolesnika s CAV-om dominiraju pomoćnički CD4<sup>+</sup> T limfociti tip 1 (engl. *T helper type 1*, Th1), dok je B limfocita i makrofaga malo. Većina ih je HLA-DR pozitivna, a interferon- $\gamma$  je jako izražen u usporedbi s bolesnicima bez CAV-a (44). Specifični put aktivacije glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase II i proliferacija Th1 limfocita već su prethodno spominjani kao važni mehanizmi u razvoju CAV (45).

Zanimljivo, retrospektivna analiza 174 ispitanika pokazala je da je smanjen broj CD4<sup>+</sup> zajedno s povećanim brojem CD8<sup>+</sup> T limfocita, odnosno da je inverzan omjer CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> povezan s ozbiljnijim stupnjem CAV (46).

#### **1.4. Uloga trombocita u nastanku vaskulopatije srčanog presatka**

U kompleksnoj patogenezi CAV-a adhezija, aktivacija i agregacija trombocita bi mogli biti jedni od mehanizama koji pridonose razvoju i progresiji ove bolesti (47). Dokazi o korisnom učinku acetilsalicilne kiseline u prevenciji CAV-a su oskudni, a antitrombocitna terapija u transplantaciji srca nije dovoljno istražena (2). *Ex vivo* studija funkcije trombocita je pokazala snažniju agregaciju trombocita nakon stimulacije adenozin difosfatom (ADP) i slabiji antiagregacijski učinak acetilsalicilne kiseline u skupini bolesnika s transplantiranim srcem u usporedbi s bolesnicima s koronarnom bolesti i zdravim kontrolama (48). Transplantirani bolesnici s CAV-om imaju snažniju ADP-om induciranu agregaciju trombocita u usporedbi s transplantiranim bolesnicima bez CAV i zdravim pojedincima (49). Također je pokazano da transplantirani bolesnici s CAV-om u usporedbi s transplantiranim bolesnicima bez CAV-a i zdravim kontrolama imaju pojačanu agregaciju trombocita sa i bez terapije acetilsalicilnom kiselinom, te autori sugeriraju da je monoterapija acetilsalicilnom kiselinom potencijalno nedostatna u inhibiciji agregacije trombocita u bolesnika s CAV-om (50). Povišena reaktivnost trombocita dokazana je u bolesnika nakon transplantacije srca koji su bili na antiagregacijskoj terapiji acetilsalicilnom kiselinom i/ili klopidogetrelom (47). Gotovo polovica bolesnika rezistentna na terapiju acetilsalicilnom kiselinom nije odgovorila na terapiju klopidogetrelom (47). Uzrok smanjenog odgovora trombocita na terapiju klopidogetrelom bi mogao biti povezan sa smanjenom proizvodnjom prostaglandina sekundarno imunosupresivnoj terapiji održavanja (48).

#### **1.5. Patohistološke promjene u vaskulopatiji srčanog presatka**

Patohistološki nalazi u CAV-u predstavljaju spektar patoloških promjena. Inicijalne promjene u CAV se događaju unutar stijenke žila i nalaze se u intimi i adventiciji (3).



Histološki nalaz uključuje subendotelno nakupljanje limfocita, prvenstveno T limfocita, hiperplaziju intime, miointimalnu proliferaciju glatkih mišićnih stanica, makrofage koji sadrže lipide i podsjećaju na pjenušave stanice u klasičnoj aterosklerozi, te perivaskularnu fibrozu (51). Infiltrati imunoloških stanica se nalaze unutar i u okolini koronarnih arterija. Za razliku od ekcentrične proliferacije stanica intime u aterosklerozi, u CAV-u se češće nalazi koncentrična proliferacija intime. Iako su najčešće difuzne, promjene u CAV-u mogu biti i fokalne (51). Sastav plaka se s vremenom mijenja od fibroznog u ranoj fazi, do kasnih plakova s nekrotičnom srži i kalcifikacijama (52).

U CAV-u dolazi do ranog pozitivnog remodeliranja, tj. kompenzatorne hipertrofije i kasnog negativnog tj. konstriktivnog remodeliranja (53). Kako se intima zadebljava, koronarne žile se dilatiraju kako bi barem neko vrijeme očuvale dimenzije lumena (54). S vremenom dolazi do negativnog konstriktivnog remodeliranja uz posljedično suženje lumena žile (53). Nedovoljna kompenzatorna hipertrofija žila je najvažniji prediktor luminalne opstrukcije (55).

Intima u CAV-u se tipično sastoji od dva sloja – luminalnog kojeg čine rahlo vezivno tkivo i često infiltrati mononuklearnih stanica, te sloja koji se nalazi odmah uz unutarnju elastičnu laminu (lat. *lamina elastica interna*) i mediju, a sastoji se od glatkih mišićnih stanica (44,56). Proliferaciju intime često prati gusta fibroza (35).

## **1.6. Klinička prezentacija vaskulopatije srčanog presatka**

Dijagnosticiranje CAV predstavlja klinički izazov, ponajprije zbog oskudnih simptoma ishemije u denerviranom presatku zbog čega u praksi koristimo rutinsko oslikavanje koronarne cirkulacije u pravilu nakon transplantacije, zatim godinu dana nakon transplantacije, a dalje svake godine ili svake druge godine ovisno o pojavi patoloških promjena. CAV se očituje poremećajem kontraktilnosti na ultrazvuku srca, slabljenjem funkcije odnosno zatajivanjem presatka, aritmijama, a ponekad infarktom miokarda i naglom srčanom smrću.

## **1.7. Lijekovi za prevenciju vaskulopatije srčanog presatka**

Za sada postoje samo dvije skupine lijekova koji smanjuju rizik razvoja CAV – statini i mTOR inhibitori (engl. *mammalian target of rapamycin*) (57–61). Jedino se za sirolimus pokazalo da usporava progresiju postojećeg CAV-a (62). Statini su dio standardnog liječenja nakon transplantacije srca (2,63). Blokatori kalcijevih kanala i inhibitori angiotenzin-konvertirajućeg

enzima (ACEI), pokazali su učinkovitost u ograničavanju rizičnih čimbenika za CAV i poboljšavanju ishoda (64,65). ACEI se najčešće koriste za liječenje hipertenzije u transplantiranih pacijenata (66). Tiazidi su se pokazali korisni u liječenju hipertenzije uzrokovane inhibitorima kalcineurina (2). Rutinska profilaksa protiv infekcije citomegalovirusom (CMV) smanjila je utjecaj ovog virusa na nastanak CAV-a. Suplementacija s antioksidativnim vitaminima (vitamin C i E) bi mogla imati koristan učinak u usporeju rane progresije CAV (67).

### **1.7.1. Statini**

Terapija statinima odmah nakon transplantacije srca postala je univerzalna praksa nakon što su sredinom 1990.-ih objavljeni rezultati istraživanja koja su pokazala povoljan učinak statina na smanjenje incidencije i smrtnosti od CAV-a (57,58,68–70). Rezultati recentnije metaanalize potvrđuju značajno manju incidenciju CAV-a među bolesnicima koji uzimaju statine (omjer izgleda, OR 0,33; 95% interval pouzdanosti, CI: 0,16-0,68; P= 0,003) (63). Osim povoljnog učinka na snižavanje razine kolesterola, statini uzrokuju o kolesterolu neovisne, pleotropne učinke kao što su promoviranje apoptoze glatkih mišićnih stanica, inhibicija angiogeneze, smanjenje broja cirkulirajućih monocita, regulacija citotoksičnosti T limfocita, inhibicija o protutijelima ovisne stanične toksičnosti, inhibicija ekspresije kompleksa histokompatibilnosti klase II i posljedične aktivacije T limfocita (14,58,63,71). Smatra se da statini putem navedenih imuno-modulirajućih učinaka, tj. protuupalnih učinaka povoljno utječu na krvne žile presatka, a također poboljšavaju vazodilataciju ovisnu o endotelu, povećavaju biodostupnost dušikovog oksida, te smanjuju oslobađanje slobodnih radikala (72). Čini se da terapija statinima visokog intenziteta nije učinkovitija od terapije statinima umjerenog intenziteta (24).

### **1.7.2. Mikofenolat mofetil**

Mikofenolat mofetil (MMF) je lijek iz skupine antimetabolita koji je u bolesnika nakon transplantacije srca pokazao značajno smanjenje smrtnosti i rizika od odbacivanja presatka u odnosu na azatioprin, ali i smanjenje zadebljavanja intime mjereno intravaskularnim ultrazvukom (73,74). MMF je preferirani lijek iz skupine inhibitora staničnog ciklusa u preko 80% pacijenata (75). MMF je predlijek koji se brzo metabolizira u mikofenolnu kiselinu (MFK) koja je reverzibilni inhibitor inozin monofosfat dehidrogenaze, enzima ključnog za *de novo* sintezu guanin nukleotida čime se selektivno sprječava proliferacija aktiviranih T- i B-limfocita (74).

### 1.7.3. mTOR inhibitori

Upotreba sirolimusa i everolimusa koji pripadaju grupi tzv. mTOR inhibitora (engl. *mammalian target of rapamycin*) značajno se povećala tijekom prošlog desetljeća, iako se još uvijek se raspravlja o ulozi ovih lijekova u transplantiranih bolesnika (76,77).

Prema podacima registra ISHLT, 1 i 5 godina nakon transplantacije oko 10% i 20% bolesnika diljem svijeta prima mTOR inhibitor kao dio imunosupresivnog liječenja (76,77).

mTOR inhibitori sprječavaju aktivaciju limfocita inhibirajući transdukciju signala ovisnu o receptoru citokina IL-2, aktivaciju regulatorne kinaze ključne za staničnu proliferaciju, i time progresiju staničnog ciklusa. U životinja kojima je presađeno srce, sirolimus je inhibirao proliferaciju endotelnih stanica i fibroblasta (78) i sprječavao vaskulopatiju presatka (79). Iako nije potpuno jasno, ali se smatra da mTOR inhibitori preveniraju CAV upravo zbog sposobnosti supresije aktivnosti endotelnih stanica i fibroblasta (62,77). Osim toga, mTOR inhibitori smanjuju rizik od infekcije CMV-om što također može objasniti povoljan učinak ovih lijekova na prevenciju CAV-a (77,80).

Rezultati nekoliko randomiziranih kliničkih studija u bolesnika s *de novo* presađenim srcem upućuju na to da je rana upotreba sirolimusa i everolimusa nakon transplantacije povezana sa smanjenjem rizika od razvoja i progresije CAV-a detektiranog intravaskularnim ultrazvukom (59–61,81). Međutim, čini se da je za liječenje već dijagnostificirane CAV učinkovit jedino sirolimus (19). Mancini i sur. su pokazali učinkovitost sirolimusa u liječenju postojeće CAV, odnosno usporenju njene progresije nakon  $4,3 \pm 2,3$  godine od transplantacije (62). Studija Asleh i sur. (82) je pokazala da je rani prijelaz sa imunosupresivne terapije održavanja temeljene na inhibitoru kalcineurina (engl. *calcineurin inhibitors*, CNIs) na terapiju temeljenu na sirolimusu povezan s manjom progresijom volumena plaka i indeksa plaka mjereno IVUS-om, s manje kliničkih događaja povezanih s CAV-om i s manjom ukupnom smrtnosti u prosječnom periodu praćenja od skoro 9 godina. Također, zapaženo je da je korist od sirolimusa najveća ukoliko se ovaj prijelaz u liječenju učini tijekom prve dvije godine nakon transplantacije. Rezultati manje studije Raichlin i sur. (83) pokazali su da kasna konverzija CNI u sirolimus usporava progresiju CAV, ali je također zamijećeno da su pokazatelji usporavanja progresije zadebljavanja intime povoljniji kod konverzije u prve dvije godine nakon transplantacije nego kasnije. Općenito, čini se da je terapija mTOR inhibitorima najučinkovitija ako se primjeni unutar dvije godine od transplantacije (2,3,82,84,85). Moguće je da učinkovitost mTOR inhibitora na promjene koronarnih arterija ovisi o vremenu primjene zbog prirode promjena koje postaju neosjetljive

na ovu terapiju – fibrozni plak u ranoj CAV, nasuprot nastanku nekrotične jegre i kalcificiranog plaka u kasnoj CAV (52).

Eisen i sur. su randomizirali 634 bolesnika s *de novo* presađenim srcem na nisku (1,5 mg/dan) ili visoku (3 mg/dan) dozu everolimusa ili azatioprin u kombinaciji s ciklosporinom, kortikosteroidima i statinima. U obje ispitivane skupine na everolimusu je bilo značajno manje onih koji su dostigli primarni kompozitni cilj koji je uključivao smrt, gubitak presatka ili retransplantaciju, gubitak u studijskom praćenju, stupanj odbacivanja presatka 3A ili više te odbacivanje s hemodinamskom nestabilnošću. Također je značajno opažen manji porast maksimalne debljine intime (engl. *maximal intimal thickness*, MIT) tijekom 12 mjeseci nakon transplantacije mjerene IVUS-om u bolesnika na obje doze everolimusa, kao i značajno manje infekcija CMV-om, ali uz značajno više bakterijskih infekcija u 3,0-mg grupi na everolimusu u odnosu na grupu na azatioprinu. Također je zapažen značajniji porast serumske koncentracije kreatinina u obje grupe bolesnika na everolimusu u odnosu na grupu na azatioprinu (86). Kritika ove studije je da nisu svi bolesnici bili podvrgnuti IVUS-u i da je bubrežna insuficijencija često bila razlog tome te da stoga najbolesniji bolesnici nisu evaluirani (87). Povišene razine kreatinina kod kombiniranja mTORi s CNI su vjerojatno posljedica potenciranja toksičnog učinaka CNI, odnosno povećanja njihove koncentracije (88).

Istraživanje Heart Save the Nephron je provedeno s ciljem ispitivanja strategije rane zamjene CNI sa sirolimusom s ciljem očuvanja bubrežne funkcije. Pokazalo se da je ovakva zamjena imunosupresivne strategije unutar 12 tjedana od transplantacije srca povezana s visokom stopom odbacivanja presatka stupnja 3A, zbog čega je navedeno istraživanje prijevremeno prekinuto (89).

Multicentrično istraživanje Eisena i sur. (90) randomiziralo je 721 bolesnika nakon *de novo* transplantacije srca u tri skupine: one koji su dobivali everolimus u dnevnoj dozi 1,5 mg ili 3,0 mg uz reduciranu dozu ciklosporina i one koji su dobivali mikofenolat mofetil u dnevnoj dozi 3 g sa standardnom dozom ciklosporina. Pokazala se neinferiornost everolimusa u dozi 1,5 mg/dan u usporedbi s mikofenolat mofetilom u sprječavanju primarnog kompozitnog ishoda koji je uključivao biopsijom dokazano odbacivanje presatka, akutno odbacivanje s hemodinamskom nestabilnosti, gubitak presatka ili retransplantaciju, smrt ili gubitak u studijskom praćenju. Iako je smrtnost nakon 2 godine praćenja bila slična između bolesnika na everolimusu 1,5 mg/dan i onih na MMF, bolesnici na 1,5 mg-dozi everolimusa imali su značajno veću smrtnost u prva 3 mjeseca ukoliko su nakon transplantacije liječeni indukcijom rATG-om i to dominantno zbog infekcija. Obzirom na zapaženu veću smrtnost u

prvoj godini u skupini bolesnika koja je primala everolimus u dozi 3 mg/dan, ovaj krak istraživanja je rano završen. Povećanje prosječne MIT na IVUS-u je bilo značajno manje u skupini liječenoj everolimusom 1,5 mg/dan naspram MMF. Godišnji porast MIT od  $0,03 \pm 0,05$  mm naspram  $0,07 \pm 0,11$  mm (60). Everolimus u dozi od 1,5 mg/dan je bio inferioran u odnosu na MMF obzirom na bubrežnu funkciju, ali je bio usporediv u bolesnika kod kojih je predefiniрана niža ciljna koncentracija ciklosporina (90).

Andreassen i sur. su u otvorenoj studiji SCHEDULE (91) randomizirali 115 ispitanika na terapiju everolimusom niže ciljne koncentracije (3-6 ng/mL) u kombinaciji s ciklosporinom niže ciljne koncentracije (n=56) ili na terapiju ciklosporinom standardne ciljne koncentracije (n=59), oboje u kombinaciji s mikofenolat mofetilom i kortikosteroidima. U prvoj skupini, ciklosporin je ukinut nakon 7 do 11 tjedana od transplantacije, pri čemu je povišena ciljna koncentracija everolimusa (6-10 ng/mL). U jednogodišnjem (91) i trogodišnjem praćenju (92) pokazano je značajno poboljšanje bubrežne funkcije u skupini s everolimusom i ranim ukidanjem ciklosporina. Praćenje IVUS-om nakon jedne i tri godine je našlo značajno smanjenje prosječnog rasta maksimalne debljine intime u skupini bolesnika liječenih everolimusom u usporedbi sa skupinom liječenih ciklosporinom. Porast MIT nakon tri godine je iznosio  $0,10 \pm 0,06$  mm naspram  $0,15 \pm 0,17$  mm. Međutim, incidencija akutnog staničnog odbacivanja stupnja  $\geq 2R$  bila je značajno veća u skupini bolesnika na everolimusu tijekom prve godine nakon transplantacije (39% naspram 14%), dok između 1. i 3. godine ova razlika nije bila statistički značajna (10,2% naspram 5,9%;  $P=0,483$ ).

Metaanaliza 14 studija s ciljem procjene učinkovitosti i sigurnosti uporabe mTOR inhibitora u bolesnika nakon transplantacije srca pokazala je smanjenje relativnog rizika od CAV-a za 61%, dok su stope mortaliteta bile slične (80). Također je pokazala da je dodavanje mTOR inhibitora imunosupresivnom režimu dovelo do smanjene progresije CAV-a i stope infekcija citomegalovirusom, po cijenu većeg rizika od toksičnosti lijeka. Kombinacija mTOR inhibitora s MMF-om također može poslužiti u svrhu smanjenja nefrotoksičnosti inducirane s CNI, ali po cijenu povećane stope akutnog staničnog odbacivanja (80).

Vrlo rana primjena everolimusa, tj. odmah nakon transplantacije je povezana s više neželjenih događaja, ponajprije s nastankom perikardijalnog izljeva u usporedbi s odgođenom primjenom 4 do 6 tjedana nakon transplantacije (34% naspram 20% bolesnika). Međutim, nije zabilježena razlika u cijeljenju rane (93). Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *The Food and Drug Administration*, FDA) prethodno je izdala *black box* upozorenje vezano uz korištenje everolimusa unutar 3 mjeseca od transplantacije srca zbog većeg rizika od smrtnosti zbog infekcije.

Zuckermann i sur. su predložili da bi bolesnici s najvećom koristi od terapije mTOR inhibitorima bili oni s *de novo* presađenim srcem i visokim rizikom od akutnog odbacivanja presatka, infekcijom citomegalovirusom, bolesnici s visokim rizikom od razvoja CAV-a te bubrežnom insuficijencijom u kojem slučaju bi se išlo na imunosupresivni protokol bez CNI. Kao kandidate za kasniji prijelaz na mTORi predložili su bolesnike s bubrežnom insuficijencijom gdje bi se išlo na imunosupresivni protokol bez CNI, te bolesnike s karcinomom kože (76).

#### **1.7.4. Acetilsalicilna kiselina (ASK)**

Iako antiagregacijska terapija ima teoretsku podlogu za moguću korist u bolesnika nakon transplantacije srca, dokazi o učinkovitosti primjene ASK u prevenciji CAV-a su limitirani. Obzirom na nedostatak randomiziranih studija nema jasnih smjernica o koristi primjene ASK u bolesnika s presađenim srcem i većina oskudnih podataka o mogućoj koristi ove terapije potječe iz opservacijskih studija (2). U skladu s time, upotreba ASK u bolesnika s transplantiranim srcem razlikuje se od centra do centra.

*Ex vivo* studija sugerira visoku učestalost rezistencije na ASK u bolesnika s transplantiranim srcem (48). S druge strane, dvije opservacijske studije pokazale su da je liječenje sa ASK do godinu dana nakon transplantacije povezano s boljim preživljenjem, nižom incidencijom CAV-a i CAV-om povezanih događaja (94,95). Jedna od navedenih opservacijskih studija Kim i sur. (95) pokazala je da je rano korištenje ASK u bolesnika s visokim rizikom od CAV-a povezano sa smanjenim rizikom razvoja umjerene do teške CAV detektirane koronarografijom. Ovi rezultati bili su konzistentni i nakon provođenja *propensity score* analize (prilagođeni omjer hazarda, HR 0,13; 95% CI, 0,03-0,59). Učestalost CAV-a je bila šest puta niža u pacijenata liječenih ASK tijekom petnaestogodišnjeg praćenja (7% naspram 37%) (94).

Prema metaanalizi iz 2021. tvrdnja da bi ASK mogla smanjiti razvoj CAV temelji se na dokazima vrlo niske pouzdanosti (96).

Uskoro očekujemo rezultate studije AERIAL koja je randomizirala bolesnike nakon transplantacije srca na ASK, klopidogrel i placebo (2).

### **1.7.5. Indukcijska terapija kunićjim antitimocitnim globulinom (rATG, Thymoglobulin)**

Postoji četrdesetgodišnje iskustvo s primjenom rATG (Thymoglobulin) u kliničkoj transplantaciji, a njegovi su učinci opsežno proučavani kod bolesnika s transplantiranim bubregom. Općenito, uloga indukcijske terapije u bolesnika s presađenim srcem nije poznata. Postoje oprečni podaci o koristi indukcijske terapije u smanjenju rizika odbacivanja u općoj populaciji bolesnika nakon transplantacije, pa tako postoji i velika varijabilnost prakse između transplantacijskih centara (97). Kandidati za indukcijsku terapiju su senzitivizirani bolesnici, bolesnici s primarnom disfunkcijom presatka, te bolesnici s bubrežnom insuficijencijom kod kojih je primjenom rATG moguće odgoditi uvođenje nefrotoksičnog CNI (98). Približno 30% bolesnika u Europi prima indukcijsku terapiju rATG-om (99).

Indukcija s trodnevnom ciklusom intravenoznog rATG povezna je s nižom stopom akutnog odbacivanja (100). Povezanost između CAV-a i akutnog odbacivanja presatka upućuje na mogućnost da pojačanom imunosupresivnom terapijom možemo spriječiti i/ili liječiti CAV. U prospektivnoj studiji iz 1998. Lamich i sur. (101) istraživali su učinak liječenja rane CAV upotrebom trodnevnih pulsniha doza metilprednizolona i rATG-a. Od 76 pacijenata njih 18 je razvilo CAV i svi su liječeni navedenom kombinacijom, te je u 68% došlo do rezolucije nalaza, pri čemu je vjerojatnost regresije promjena bila veća ako je dijagnoza CAV-a, odnosno njeno liječenje bilo unutar nego nakon prve posttransplantacijske godine (92% naspram 40%). S napomenom da je ispitivana populacija u to vrijeme liječena starom imunosupresivnom terapijom koja je uključivala ciklosporin i azatioprin, te je pitanje preslikavanja rezultata ove studije na današnju praksu. Navedeno liječenje nije postalo dio rutinske kliničke prakse. Međutim, rATG ima važnu ulogu u liječenju bolesnika s transplantiranim srcem, posebno u smanjenju rizika odbacivanja presatka kod visokorizičnih bolesnika (102). Također, njegovo korištenje omogućava odgađanje početka terapije CNI u ranom posttransplantacijskom razdoblju, te time pogoduje oporavku bubrežne funkcije (102,103).

rATG je poliklonalni globulin izoliran iz seruma kunića, smanjuje stope akutnog odbacivanja brzim smanjenjem cirkulirajućih T limfocita putem apoptoze i citolize. rATG sadrži protutijela na antigene na stanicama prirodnim ubojicama, B limfocitima i plazma stanicama, kao i protutijela na brojne adhezijske molekule i kemokinske receptore (104). Osim što uzrokuje limfopeniju, rATG modulira adhezijske i signalizirajuće molekule, utječe na funkciju dendritičkih stanica i inducira apoptozu B limfocita (103). Dokazi iz životinjskih modela i kliničke transplantacije bubrega pokazali su o dozi ovisnu depleciju T-limfocita izazvanu

rATG-om (105–107). U teoriji, učinak rATG može se ostvariti kroz imunološke i neimunološke mehanizme (25). Bolesnici koji primaju rATG naspram onih koji ga ne primaju imaju značajno manje ishemijsko-reperfuzijske ozljede detektirane tjednim biopsijama u prvom posttransplantacijskom mjesecu (74,8% naspram 63,5%) (108). Ovaj učinak potvrđen je u slučaju transplantiranog bubrega (109). Također, postoji mogućnost da rATG smanjuje stvaranje novih protutijela nakon transplantacije (103).

Nekoliko jednocentričnih retrospektivnih studija upućuju na to da bi rATG mogao imati ulogu u smanjenju rizika od nastanka CAV (97,98,110). Zuckermann i sur. (111) analizirali su rizične čimbenike za nastanak CAV u 662 ispitanika koji su preživjeli barem prvu posttransplantacijsku godinu. Tijekom petogodišnjeg praćenja 16,9% ispitanika je razvilo CAV. Analiza podataka je pokazala da je indukcijska terapija rATG-om u usporedbi s drugom vrstom indukcijske terapije imala značajan zaštitni učinak za nastanak CAV-a (relativni rizik, RR 0,634;  $P < 0,001$ ), odnosno teške CAV (RR 0,227;  $P < 0,001$ ). U jednocentričnoj studiji provedenoj na 163 pacijenta praćenih 10 godina opažena je manja stopa CAV-a tijekom vremena: 7%, 32% i 50% u 1., 5. i 10. godini u skupini rATG (prosječna ukupna doza 5,2 mg/kg) naspram 7%, 42% i 70% u 48 kontrola koje nisu primile nikakvu indukcijsku terapiju (100). Još jedna jednocentrična studija (112) s desetogodišnjim praćenjem 40 ispitanika s transplantiranim srcem usporedila je kliničku učinkovitost IL-2 receptor antagonista BT563 i rATG, te je pokazala slabiju učinkovitost BT563 u prevenciji akutnog odbacivanja presatka i CAV-a nakon 10 godina, uz napomenu da su doze rATG bile izuzetno visoke (110).

Rezultati studije Zhang i sur. (113) nakon  $13,4 \pm 4,6$  godina praćenja sugeriraju da indukcijska terapija rATG-om ima dugoročno povoljan učinak na incidenciju i težinu CAV-a, što se nije našlo za OKT3. Međutim, indukcijska terapija s rATG ili OKT3 nije imala učinka na dugoročno preživljenje bolesnika, a u skupini liječenih rATG-om je zapažena veća incidencija neoplazmi.

Rezultati nerandomizirane jednocentrične studije Azarbala i sur. (25) upućuju na povezanost uporabe rATG i manje progresije koronarnog plaka detektiranog intravaskularnim ultrazvukom u prvoj posttransplantacijskoj godini čak i u eri modernog imunosupresivnog liječenja. rATG u prosjeku od  $3,9 \pm 1,2$  doze je primilo 105 od 252 ispitanika. Među njima je bilo više senzibiliziranih bolesnika, sa znatno višim vršnim predtransplantacijskim vrijednostima PRA (engl. *panel-reactive antibodies*) (40% naspram 9,2%) i znatno veći postotak visokosenzitiviziranih bolesnika, tj. onih s  $PRA \geq 25\%$  (54,3% naspram 14,3%). Bolesnici koji su primili rATG imali su sporiju progresiju plaka mjerenu kao promjena



maksimalne intimalne areje, maksimalnog postotka stenozе, maksimalne debljine intime i volumena plaka. Zabilježen je trend veće stope infekcija u prvoj godini i odbacivanja presatka dokazanog biopsijom u skupini liječenih rATG-om. Preživljenje i odbacivanje presatka koje zahtjeva liječenje nisu se razlikovali među skupinama. Zamjerke ovoj studiji su opservacijska narav, to što je jednocentrična te činjenica da nisu svi ispitanici bili podvrgnuti praćenju IVUS-om.

Sustavni pregled kanadskih autora (114) pokazao je da u je usporedbi s bolesnicima koji uopće nisu primili indukcijsku terapiju, primjena rATG-a bila povezana sa značajnim smanjenjem rizika od odbacivanja presatka (RR 0,87, 95% CI 0,80-0,94), dok primjena basiliksimaba nije bila povezana (RR 1,02, 95% CI 0,89-1,16). Smrtnost nakon 1 godine je bila slična u bolesnika sa ili bez indukcijske terapije. Indukcija s rATG-om je povezana s manjim rizikom odbacivanja presatka nego s basiliksimabom (RR 0,85, 95% CI 0,77-0,94), ali je smrtnost bila slična (RR 1,14, 95% CI 0,40-3,23). Ipak, vjerojatno zbog malog ukupnog broja događaja i nedovoljne snage randomiziranih kliničkih studija, smanjenje rizika od odbacivanja u slučaju rATG u usporedbi sa slučajevima bez indukcijske terapije ili terapije basiliksimabom nije statistički značajno. Naravno, ostaje otvoreno pitanje koristi indukcijske terapije u specifičnim populacijama bolesnika. Multidisciplinarni panel eksperata je 2024. donio praktične preporuke prema kojima je u selektiranoj skupini bolesnika uputno koristiti indukciju rATG-om, a ne basiliksimab; dok se rutinska uporaba bilo koja od ta dva lijeka se ne preporuča (slaba preporuka (115)).

Retrospektivna analiza Bellumkonda i sur. (97) usporedila je tri skupine bolesnika: skupinu na T-deplecijskoj terapiji (rATG, ATGAM i alemtuzumab), skupinu na antagonistima IL-2 receptora (basiliksimab i daklizumab) i skupinu bez indukcijske terapije. Autori nisu mogli analizirati učinak rATG na CAV zbog nedostatka podataka, ali su pokazali da je indukcija s T-deplecijskim lijekovima povezana sa smanjenim rizikom od odbacivanja presatka na kraju prve godine (OR 0,82, CI 0,76-0,88;  $P < 0,001$ ), bez učinka na mortalitet, dok indukcijska terapija antagonistima IL-2 receptora nije utjecala na rizik od odbacivanja, ali je bila je povezana s malim iako statistički značajnim porastom smrtnosti.

## **2. Hipoteza**

Obzirom da je vaskulopatija srčanog presatka (CAV) posljedica imunološki posredovanih mehanizama, a drži se da i trombociti mogu igrati važnu ulogu u njenom nastanku, hipoteza ovog istraživanja je da bolesnici koji nakon transplantacije srca i indukcijskog liječenja rATG-om (Thymoglobulinom) imaju veći pad broja limfocita i trombocita u perifernoj krvi imaju manju incidenciju CAV.

## **3. Ciljevi rada**

Opći cilj ovog rada jest istražiti povezanost broja limfocita i trombocita u perifernoj krvi u ranom poslijetransplantacijskom periodu nakon indukcijskog liječenja rATG-om (Thymoglobulinom) s učestalosti vaskulopatije presatka u bolesnika nakon tri godine od transplantacije srca.

Sekundarni ciljevi istraživanja:

- 1.** Ispitati učestalost CAV-a nakon 3 godine od transplantacije srca
- 2.** Ispitati povezanost CAV-a nakon 3 godine od transplantacije srca s demografskim i kliničkim osobinama darivatelja (dob, spol, indeks tjelesne mase) i bolesnika (dob, spol, indeks tjelesne mase, nikotinizam, hiperkolesterolemija, šećerna bolest, acetilsalicilna kiselina u terapiji), te laboratorijskim podacima bolesnika (ukupni kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, HbA1c, kreatinin i eGFR)
- 3.** Ispitati povezanost CAV-a nakon 3 godine od transplantacije srca s laboratorijskim podacima bolesnika na kraju 3. godine nakon transplantacije (ukupni kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, kreatinin, eGFR, NT-proBNP)

## 4. Ispitanici i metode

### 4.1. Ispitanici i metode

U ovu retrospektivnu studiju uključili smo bolesnike kojima je učinjena transplantacija srca u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u razdoblju od siječnja 2010. do prosinca 2017. godine. Uključni kriteriji bili su upotreba indukcijskog liječenja rATG-om nakon transplantacije, dob  $\geq 18$  godina, dostupnost kompletne krvne slike s diferencijalnim brojem leukocita na dan 0. tj. neposredno prije transplantacije, 7., 14. i 21. poslije transplantacije srca, kao i podatci o praćenju vaskulopatije presatka 3 godine nakon uspješne *de novo* transplantacije srca. Studija je odobrena od strane etičkih povjerenstava Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Svi bolesnici su potpisali informirani pristanak.

Od ukupno 161 bolesnika kojima je transplantirano srce u ovom periodu, 94 ih je uključeno u studiju. Svi bolesnici su primili indukcijsku terapiju rATG-om (Thymoglobulin, Sanofi Genzyme, Cambridge, Mass, USA) tijekom 5 dana nakon transplantacije u dnevnoj od dozi 1,5 mg/kg. Imunosupresivna terapija održavanja sastojala se od kalcineurinskog inhibitora (CNI), tj. ciklosporina ili takrolimusa, inhibitora staničnog ciklusa, tj. mikofenolat mofetila ili everolimusa i prednizolona. Koncentracije CNI i everolimusa održavane su u ciljnom rasponu u skladu s vremenom proteklom od transplantacije.

Svim bolesnicima smo određivali kompletnu krvnu sliku s diferencijalnim brojem leukocita 0. dan, te 7., 14. i 21. poslijetransplantacijski dan.

Prikupljeni su podatci o bolesnicima u trenutku hospitalizacije uključujući dob, spol, indeks tjelesne mase, nikotinizam, hiperkolesterolemija, šećerna bolest, acetilsalicilna kiselina u terapiji do transplantacije, te laboratorijski podatci o ukupnom kolesterolu, LDL-kolesterolu, HDL-kolesterolu, HbA1c, kreatininu i eGFR. Također su prikupljeni podatci o dobi, spolu i indeksu tjelesne mase njihovih darivatelja.

Na kraju prve i treće godine praćenja nakon transplantacije također su prikupljeni laboratorijski podatci o ukupnom kolesterolu, LDL-kolesterolu, HDL-kolesterolu, kreatininu, eGFR te koncentracijama NT-proBNP-a (engl. *N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide*).

Unutar prva 3 mjeseca nakon transplantacije učinjena je bazalna koronarna angiografija nakon koje su slijedile kontrolne koronarografije nakon jedne i tri godine od transplantacije. Koronarografija je učinjena i u drugoj godini ako je nalaz koronarografije nakon prve godine bio patološki. Koronarografija je učinjena transradijalnim ili transfemoralnim pristupom. Nakon intrakoronarne injekcije nitroglicerina učinjene su standardne višestruke projekcije lijeve i desne koronarne arterije. Dijagnoza i težina vaskulopatije je postavljena prema kriterijima ISHLT iz 2010. Godine. Konačna procjena stupnja CAV za svakog pacijenta napravljena je uključivanjem nalaza ehokardiografije i kateterizacije srca.

Primarni ishod praćenja bila je dijagnoza CAV stupnja  $\geq 1$  nakon 3 godine praćenja.

#### **4.2. Statistička obrada**

Normalno distribuirane kontinuirane varijable prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Nenormalno distribuirane kontinuirane varijable prikazane su kao medijani vrijednosti s pridruženim interkvartilnim rasponima (engl. *interquartile range*, IQR). Za provjeru statističke značajnosti između skupina za kontinuirane varijable korišten je Studentov T-test ili Mann Whitney test.

Kategoričke varijable izražene su u apsolutnim (n) i relativnim (%) frekvencijama, a statistička važnost razlika između tih varijabli izračunavana je pomoću  $\chi^2$ -testa ili Fisherovog testa (ako su apsolutne frekvencije bile manje od 5).

Da bi se identificirali prediktori CAV-a, bolesnici su podijeljeni u dvije skupine kao bolesnici koji su razvili CAV i bolesnici koji nisu razvili CAV.

Ukupno 44 varijabli koje odražavaju demografiju i laboratorijske vrijednosti testirane su na povezanost s primarnim ishodom u univarijantnim binarnim regresijskim modelima. U multivarijabilnu analizu uvršteni su poznati čimbenici rizika za CAV kao i oni utvrđeni kao značajni u univarijantnoj analizi ( $p < 0,1$ ): dob darivatelja, broj limfocita 7. dan poslije transplantacije, broj trombocita 7. i 14. dan poslije transplantacije, te broj leukocita 21. dan poslije transplantacije.

Statistički značajnom se smatrala vrijednost  $p < 0,05$ .

Za statističku obradu korišten je softverski program SPSS 23.0 (IBM, Armonk, NY, United States).

## 5. Rezultati

U istraživanju je sudjelovalo 94 ispitanika (21 žena i 73 muškaraca) prosječne dobi  $51 \pm 13.3$  godina. Osnovne demografske i kliničke karakteristike bolesnika i njihovih darivatelja prikazane su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Osnovni demografski podatci i kliničke karakteristike bolesnika

	Bolesnici s CAV* (n=25)	Bolesnici bez CAV* (n=69)	p
Spol primatelja			
Muškarci	20 (80,0)	53 (76,81)	0,798
Žene	5 (20,0)	16 (23,19)	
Dob primatelja, medijan (IQR), godine	50 (40-61)	53 (47-60)	0,584
Dob darivatelja, medijan (IQR), godine	47 (40-49)	37 (28-49)	0,017
Indeks tjelesne mase (ITM) darivatelja, medijan (IQR), kg/m <sup>2</sup>	25 (24-28,5)	26 (23-28,5)	0,949
Nikotinizam <sup>1</sup>	11 (44,0)	35 (50,72)	0,399
Hiperkolesterolemija u vrijeme HTx	10 (40,0)	29 (42,03)	0,272
Šećerna bolest u vrijeme HTx	4 (16,0)	13 (18,84)	1,0
ASK u liječenju do transplantacije	2 (8,0)	10 (14,49)	0.722
Podatci su prikazani kao n (%) ako nije drugačije navedeno.			
*CAV $\geq$ 1. stupnja na kraju 3. godine poslije transplantacije srca.			
<sup>1</sup> Nikotinizam u anamnezi ili u vrijeme transplantacije srca.			
Kratice: ASK – acetilsalicilna kiselina; CAV – vaskulopatija srčanog presatka; IQR – interkvartilni raspon; HTx – transplantacija srca; p – statistička značajnost.			

Usporedba predtransplantacijskih i poslijetransplantacijskih laboratorijskih vrijednosti između skupine bolesnika s CAV-om i skupine bez CAV-a prikazana je u Tablici 2.

**Tablica 2.** Predtransplantacijske i poslijetransplantacijske laboratorijske vrijednosti bolesnika

	Bolesnici s CAV* (n=25)	Bolesnici bez CAV* (n=69)	p
ukupni kolesterol prije transplantacije, mmol/L	3,93 ± 1,34	3,626 ± 1,17	0,465
LDL-C prije transplantacije, mmol/L	2,468 ± 1,001	2,230 ± 0,941	0,471
HDL-C prije transplantacije, mmol/L	0,927 ± 0,354	0,875 ± 0,305	0,633
kreatinin prije transplantacije, µmol/L	107,23 ± 25,24	109,694 ± 40,142	0,833
eGFR prije transplantacije, ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	70,92 ± 16,35	69,30 ± 20,00	0,787
ukupni kolesterol 1 godinu nakon transplantacije, mmol/L	4,268 ± 1,758	4,469 ± 1,284	0,568
LDL-C 1 godinu nakon transplantacije, mmol/L	2,228 ± 1,097	2,199 ± 0,832	0,897
HDL-C 1 godinu nakon transplantacije, mmol/L	1,338 ± 0,650	1,532 ± 0,541	0,194
kreatinin 1 godinu nakon transplantacije, µmol/L	103,27 ± 34,25	111,43 ± 59,67	0,546
eGFR 1 godinu nakon transplantacije, ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	68,68 ± 22,02	69,23 ± 22,56	0,922

NT-proBNP 1 godinu nakon transplantacije, medijan (IQR), pg/mL	355 (195-527)	259 (131-367)	0,461
ukupni kolesterol 3 godine nakon transplantacije, mmol/L	3,746 ± 1,470	3,705 ± 1,452	0,910
LDL-C 3 godine nakon transplantacije, mmol/L	2,081 ± 0,802	1,996 ± 0,842	0,680
HDL-C 3 godine nakon transplantacije, mmol/L	1,215 ± 0,487	1,233 ± 0,493	0,878
kreatinin 3 godine nakon transplantacije, µmol/L	102,09 ± 37,25	105,75 ± 51,73	0,761
eGFR 3 godine nakon transplantacije, ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	76,68 ± 20,74	73,11 ± 26,08	0,563
NT-proBNP 3 godine nakon transplantacije, medijan (IQR), pg/mL	427 (215,5-705,5)	225 (132-500)	0,047
<p>Podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ako nije drugačije navedeno.</p> <p>*CAV ≥ 1. stupnja na kraju 3. godine poslije transplantacije srca.</p> <p>Kratice: CAV – vaskulopatija srčanog presatka; LDL-C – lipoprotein niske gustoće kolesterol; HDL-C – lipoprotein visoke gustoće kolesterol; HbA1c – glikirani hemoglobin; eGFR – procijenjena glomerularna filtracija; IQR- interkvartilni raspon; NT-proBNP - N-terminalni prohormon moždanog natriuretskog peptide; p – statistička značajnost.</p>			

Vrijednosti diferencijalne krvne slike na dane 0., 7., 14. i 21. poslije transplantacije prikazane su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Vrijednosti diferencijalne krvne slike na dan 0., 7., 14. i 21. poslije transplantacije

	Bolesnici s CAV* (n=25)	Bolesnici bez CAV* (n=69)	p
leukociti 0.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	8030 (6340-11270)	7870 (6608-9400)	0,878
limfociti 0.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	1354 (767-1989)	1507 (1022-2023)	0,324
bazofili 0.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	30 (13-43)	34 (20-50)	0,208
eozinofili 0.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	98 (32-230)	129 (63-225)	0,383
monociti 0.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	693 (561-1018)	658 (495-865)	0,522
trombociti 0.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	202 (162-270)	197 (154-257)	0,529
leukociti 7.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	9700 (6390-1160)	9000 (6600-11840)	0,922
limfociti 7.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	190 (95-318)	130 (79-211)	0,085
bazofili 7.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	18 (0-26)	6 (0-13)	0,146
eozinofili 7.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	0 (0-0)	0 (0-9)	0,172
monociti 7.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	301 (189-470)	340 (219-464)	0,419
trombociti 7.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	140 (103-156)	105 (68-147)	0,035
leukociti 14.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	11115 (9440-13585)	10560 (8550-13100)	0,286
limfociti 14.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	335 (184-614)	215 (105-401)	0,023
bazofili 14.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	12 (10-20)	16 (9-50)	0,221
eozinofili 14.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	13 (0-51)	29 (0-91)	0,436
monociti 14.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	610 (364-769)	458 (294-605)	0,060
trombociti 14.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	249 (175-322)	208 (150-266)	0,205
leukociti 21.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	8100 (6000-9600)	6600 (5000-7935)	0,032
limfociti 21.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	381 (200-530)	256 (166-336)	0,090
bazofili 21.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	14 (2-69)	40 (3-50)	0,697



eozinofili 21.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	34 (13-114)	50 (12-100)	0,615
monociti 21.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	358 (271-488)	310 (240-438)	0,353
trombociti 21.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	237 (195-278)	193 (148-226)	0,032
Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).			
*CAV ≥ 1. stupnja na kraju 3. godine poslije transplantacije srca.			
Kratice: CAV – vaskulopatija srčanog presatka; p – statistička značajnost.			

Tijekom 3 godine nakon transplantacije srca ukupno je 25 (26,6%) bolesnika razvilo CAV stupnja ≥1.

Bolesnici koji su razvili CAV imali su značajno starijeg darivatelja (47 (IQR 40-49) naspram 37 (IQR 28-49) godina; p=0,02), veći prosječni broj trombocita 7. dan nakon transplantacije (140 x 10<sup>9</sup>/L (IQR 103-156 x 10<sup>9</sup>/L) naspram 105 x 10<sup>9</sup>/L (IQR 68-147 x 10<sup>9</sup>/L); p=0,04), veći apsolutni broj limfocita 14. dan nakon transplantacije (335 x 10<sup>9</sup>/L (IQR 184-314 x 10<sup>9</sup>/L) naspram 215 x 10<sup>9</sup>/L (IQR 105-401 x 10<sup>9</sup>/L); p=0,02) i veći prosječni broj trombocita 21. dan nakon transplantacije (237 x 10<sup>9</sup>/L (IQR 195-278 x 10<sup>9</sup>/L) naspram 193 x 10<sup>9</sup>/L (IQR 148-226 x 10<sup>9</sup>/L); p=0,03).

Bolesnici koji su tijekom 3 godine od transplantacije razvili CAV imali su značajno više vrijednosti serumske koncentracije NT-proBNP izmjerene u 3. godini (427 pg/mL (IQR 215,5-705,5 pg/mL) naspram 225 pg/mL (IQR 132-500 pg/mL); p=0,047).

Univarijatna binarna logistička regresija pokazala je povezanost CAV-a nakon 3 godine od transplantacije sa starijom dobi darivatelja, apsolutnim brojem limfocita ≥200 x 10<sup>9</sup>/L 7. dan i većim brojem trombocita 7. i 21. dan nakon transplantacije i indukcijske terapije (Tablica 4).

U model multivarijabilne regresijske analize uvršteni su parametri koji su se pokazali statistički značajni u univarijatnoj regresiji (p<0,1). Model je pokazao da su starija dob darivatelja (p=0,027) i veći broj trombocita 21. dan nakon transplantacije i indukcijskog liječenja (p=0,04) bile nezavisne varijable koje su utjecale na nastanak CAV-a.

**Tablica 4.** Univarijatna regresijska analiza za nastanak CAV-a (samo značajne varijable)

	OR	95% CI		p
Dob darivatelja, godine	1,063	10,14	1,113	0,010
Apsolutni broj limfocita ≥200 x 10 <sup>9</sup> /L 7. dan	0,354	0,126	0,998	0,050
Trombociti 7.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	1,010	1,001	1,020	0,028
Leukociti 21.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	1,000	1,000	1,000	0,028
Trombociti 21.dan, x 10 <sup>9</sup> /L	1,009	1,000	1,017	0,043

Kratice: CI – interval pouzdanosti; OR – omjer izgleda; p - statistička značajnost.

## 6. Rasprava

Naše istraživanje našlo je učestalost CAV-a 3 godine nakon transplantacije srca u 26,6% naših bolesnika. Ovaj rezultat je u skladu s poznatim epidemiološkim podacima o CAV. Našli smo da se CAV češće javlja u bolesnika koji su dobili presadak od starijih darivatelja, što je u skladu s ranije objavljenim podacima (116). Također, bolesnici s dijagnozom CAV-a nakon tri godine od transplantacije su očekivano imali značajno više serumske koncentracije NT-proBNP, serumskog biljega srčanog popuštanja.

Također smo našli da su bolesnici s dijagnozom CAV-a nakon 3 godine od transplantacije srca imali veći broj limfocita u perifernoj krvi izmjeren 14. poslijetransplantacijski dan, ali i 7. i 21. dan, iako je ovdje razlika bila blizu statističke značajnosti, odnosno da su ovi bolesnici 7. poslijetransplantacijski dan rjeđe postigli ciljni broj limfocita u perifernoj krvi  $<200 \times 10^9/L$ . Lijekovi poput rATG koji smanjuju broj limfocita (engl. *lymphocyte-depleting antibodies*, LDAs) ne koriste se univerzalno zbog postojanja proturiječnih rezultata o njihovoj sveukupnoj korisnosti. U usporedbi s nekorisćenjem indukcijske terapije, nekoliko studija je pokazalo da je indukcija s LDA povezana s manjim rizikom od CAV-a (25,100,111,113). Djelovanje rATG se ostvaruje putem imunoloških, ali i neimunoloških učinaka kao što su ublažavanje reperfuzijsko-ishemijske ozljede (109). Bolesnici koji su razvili CAV i koji su imali učestalije epizode odbacivanja imaju veću T-staničnu aloreaktivnost u prvih 6 mjeseci nakon transplantacije kao i perzistentnu T staničnu aloreaktivnost nakon prvih 6 mjeseci od transplantacije (117). rATG ima opći limfopenični učinak na sve podvrste T limfocita od 14 dana do 3 mjeseca nakon njegove administracije (118). Vaskulopatija srčanog presatka je dominantno imunološki posredovana, pa je logično da je limfopenija nakon indukcije rATG-om poželjan terapijski učinak. Nema snažnih dokaza o korisnosti indukcije rATG-om i prevencije odbacivanja, iako su studije koje su ovo istraživale heterogene i teško je izvesti zaključak (119).

Poznato je da u bolesnika nakon transplantacije srca postoji povišena *in vitro* reaktivnost trombocita, odnosno da trombociti pokazuju pojačanu ekspresiju P-selektina i CD63. Također, trombociti sadrže značajno povišene razine topljivog CD40 liganda i oslobađaju veću količinu citokina nakon stimulacije SFLLRN-om (engl. *thrombin receptor activation peptide*) izmjereno EIA-om (engl. *enzyme immunoassay*) (120). Trombociti sudjeluju u nastanku tromboze koronarnih žila, ozljedi endotela i vaskularnoj upali, a svi navedeni procesi imaju ulogu u patogenezi CAV-a. Povišena reaktivnost trombocita u bolesnika s transplantiranim srcem povezana je s neželjnim kardiovaskularnim događajima (121,122). Međutim, nijedna studija koja je istraživala učinke rATG-a u bolesnika nakon transplantacije

srca nije predložila smanjenje broja trombocita kao mogući mehanizam prevencije CAV-a. Dapače, trombocitopenija se smatra neželjnim događajem nakon terapije rATG-om (123,124).

Ovim istraživanjem smo pokazali da je veći broj trombocita u perifernoj krvi izmjeren 7. i 21. dan nakon transplantacije i indukcije rATG-om bio povezan s većom incidencijom CAV-a nakon 3 godine praćenja. Bolesnici s CAV-om su imali veći broj trombocita izmjeren i 14. dan, ali je ova razlika bila statistički neznačajna. Multivarijabilna logistička regresija je pokazala da su upravo veći broj trombocita u perifernoj izmjeren 21. poslijetransplantacijski dan i starija dob donora najjače povezani s pojavom CAV-a tijekom 3 godine nakon transplantacije srca.

Nisu svi bolesnici nakon transplantacije i indukcije rATG-om jednako reagirali padom broja trombocita. Upravo bi ovakav varijabilni odgovor trombocita na primjenu rATG mogao objasniti proturiječne rezultate dosadašnjih studija koje su istraživale učinak rATG-a u prevenciji CAV na način da će korist od rATG-a imati upravo oni bolesnici koji su reagirali jačim padom broja trombocita.

Naša studija ima nekoliko ograničenja. Prvo je retrospektivni dizajn studije zbog čega su kod nekih bolesnika podatci bili nepotpuni što je moglo donekle utjecati na analizu rezultata. Također, radilo se o jednocentričnoj studiji te se dobiveni rezultati ne mogu translirati na opću populaciju transplantiranih bolesnika.

Ipak, rezultati ove studije bi mogli otvoriti prostor novim prospektivnim istraživanjima na većem broju ispitanika kojim bi se ispitala moguća korist od smanjivanja broja i/ili funkcije trombocita nakon transplantacije srca kao mogućeg terapijskog pristupa u prevenciji vaskulopatije srčanog presatka koja predstavlja jedno od glavnih ograničenja trajnosti srčanog presatka i preživljenja bolesnika nakon transplantacije srca.

## **7. Zaključak**

Niži broj trombocita nakon indukcije rATG-om je povezan s manjim rizikom od nastanka CAV-a tijekom 3 godine nakon transplantacije srca. Varijabilni odgovor trombocita na primjenu rATG mogao bi objasniti proturiječne rezultate dosadašnjih studija na način da korist od rATG-a u prevenciji CAV-a imaju upravo oni bolesnici koji na ovaj lijek reagiraju većim padom broja trombocita.

## **8. Zahvale**

Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Bošku Skoriću na savjetima, strpljenju i vodstvu tijekom pisanja ovog rada, a koji me svojim pristupom i stručnošću motivirao na daljnja istraživanja kako ovog specifičnog područja kardiologije tako i generalno.

Također zahvaljujem dr. Dori Fabijanović koja mi je pomogla pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima i posebno majci Heli na bezuvjetnoj podršci.

## 9. Literatura

1. Khush KK, Hsich E, Potena L, Cherikh WS, Chambers DC, Harhay MO, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-eighth adult heart transplantation report — 2021; Focus on recipient characteristics. *J Heart Lung Transplant*. 2021 Oct;40(10):1035-1049.
2. Velleca A, Shullo MA, Dhital K, Azeka E, Colvin M, DePasquale E, et al. The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2023;42(5).
3. Pober JS, Chih S, Kobashigawa J, Madsen JC, Tellides G. Cardiac allograft vasculopathy: Current review and future research directions. *Cardiovasc Res*. 2021 Nov 22;117(13):2624-2638.
4. Lu WH, Palatnik K, Fishbein GA, Lai C, Levi DS, Perens G, et al. Diverse morphologic manifestations of cardiac allograft vasculopathy: A pathologic study of 64 allograft hearts. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(9).
5. Hiemann NE, Wellnhofer E, Knosalla C, Lehmkuhl HB, Stein J, Hetzer R, et al. Prognostic impact of microvasculopathy on survival after heart transplantation: Evidence from 9713 endomyocardial biopsies. *Circulation*. 2007;116(11).
6. Clerkin KJ, Topkara VK, Farr MA, Jain R, Colombo PC, Restaino S, et al. Noninvasive Physiologic Assessment of Cardiac Allograft Vasculopathy Is Prognostic for Post-Transplant Events. *J Am Coll Cardiol*. 2022;80(17).
7. Tuzcu EM, Kapadia SR, Sachar R, Ziada KM, Crowe TD, Feng J, et al. Intravascular ultrasound evidence of angiographically silent progression in coronary atherosclerosis predicts long-term morbidity and mortality after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(9).
8. Kobashigawa JA, Tobis JM, Starling RC, Tuzcu EM, Smith AL, Valentine HA, et al. Multicenter intravascular ultrasound validation study among heart transplant recipients: Outcomes after five years. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(9).
9. Kobashigawa JA. First-year intravascular ultrasound results as a surrogate marker for outcomes after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2003 Jul;22(7):711-4.
10. Mehra MR, Ventura HO, Stapleton DD, Smart FW, Collins TC, Ramee SR. Presence of severe intimal thickening by intravascular ultrasonography predicts cardiac events in cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 1995;14(4).
11. Shahandeh N, Parikh RV. Invasive Intracoronary Imaging of Cardiac Allograft Vasculopathy: Established Modalities and Emerging Technologies. *Interv Cardiol Clin*. 2023 Apr;12(2):269-280

12. Rickenbacher PR, Pinto FJ, Lewis NP, Hunt SA, Alderman EL, Schroeder JS, et al. Prognostic importance of intimal thickness as measured by intracoronary ultrasound after cardiac transplantation. *Circulation*. 1995;92(12).
13. Chih S, Chong AY, Dzavik V, So DY, Aleksova N, Wells GA, et al. Fibrotic Plaque and Microvascular Dysfunction Predict Early Cardiac Allograft Vasculopathy Progression after Heart Transplantation: The Early Post Transplant Cardiac Allograft Vasculopathy Study. *Circ Heart Fail*. 2023 Jun 1;16(6):E010173.
14. Tremblay-Gravel M, Racine N, de Denus S, Ducharme A, Pelletier GB, Giraldeau G, et al. Changes in Outcomes of Cardiac Allograft Vasculopathy Over 30 Years Following Heart Transplantation. *JACC Heart Fail*. 2017;5(12).
15. Nikolova AP, Kobashigawa JA. Cardiac allograft vasculopathy: The enduring enemy of cardiac transplantation. *Transplantation*. 2019 Jul;103(7):1338-1348.
16. Chih S, Chong AY, Mielniczuk LM, Bhatt DL, Beanlands RSB. Allograft Vasculopathy the Achilles' Heel of Heart Transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Jul 5;68(1):80-91.
17. Dasari TW, Hennebry T a, Hanna EB, Saucedo JF. Drug eluting versus bare metal stents in cardiac allograft vasculopathy: a systematic review of literature. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2011;77(7).
18. Skoric B, Bulum J, Cikes M, Jurin H, Lovric D, Ljubas-Macek J, et al. Drug-Eluting Balloons—A New Tool in the Treatment of Cardiac Allograft Vasculopathy: A Case Series. *Transplant Proc*. 2017;49(7).
19. Skorić B, Čikeš M, Maček JL, Baričević Ž, Škorak I, Gašparović H, et al. Cardiac allograft vasculopathy: Diagnosis, therapy, and prognosis. *Croat Med J*. 2014;55(6).
20. Goldraich LA, Stehlik J, Kucheryavaya AY, Edwards LB, Ross HJ. Retransplant and medical therapy for cardiac allograft vasculopathy: International society for heart and lung transplantation registry analysis. *Am J Transplant*. 2016 Jan;16(1):301-9.
21. Starling RC, Armstrong B, Bridges ND, Eisen H, Givertz MM, Kfoury AG, et al. Accelerated Allograft Vasculopathy With Rituximab After Cardiac Transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(1).
22. Valantine HA. Cardiac allograft vasculopathy: Central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma". *Transplantation*. 2003;76, 891-899.
23. Pober JS, Jane-Wit D, Qin L, Tellides G. Interacting mechanisms in the pathogenesis of cardiac allograft vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Aug;34(8):1609-14.
24. Ellimuttill TM, Harrison K, Rollins AT, Feurer ID, Rega SA, Gray J, et al. Effect of Statin Intensity on the Progression of Cardiac Allograft Vasculopathy. *Card Fail Rev*. 2021;7.

25. Azarbal B, Cheng R, Vanichsarn C, Patel JK, Czer LS, Chang DH, et al. Induction Therapy with Antithymocyte Globulin in Patients Undergoing Cardiac Transplantation Is Associated with Decreased Coronary Plaque Progression as Assessed by Intravascular Ultrasound. *Circ Heart Fail*. 2016;9(1).
26. Chrysakis N, Magouliotis DE, Spiliopoulos K, Athanasiou T, Briasoulis A, Triposkiadis F, et al. Heart Transplantation. *J Clin Med*. 2024 Jan 18;13(2):558.
27. Tambur AR, Pamboukian S V., Costanzo MR, Herrera ND, Dunlap S, Montpetit M, et al. The presence of HLA-directed antibodies after heart transplantation is associated with poor allograft outcome. *Transplantation*. 2005;80(8).
28. Lund LH, Edwards LB, Dipchand AI, Goldfarb S, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Heart Transplantation Report—2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. *J Heart Lung Transplant*. 2016;35(10).
29. Loupy A, Loupy A, Coutance G, Bonnet G, Bonnet G, Van Keer J, et al. Identification and characterization of trajectories of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: A population-based study. *Circulation*. 2020 Jun 16;141(24):1954-1967.
30. Loupy A, Toquet C, Rouvier P, Beuscart T, Bories MC, Varnous S, et al. Late failing heart allografts: Pathology of cardiac allograft vasculopathy and association with antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2016;16(1).
31. Smith JD, Banner NR, Hamour IM, Ozawa M, Goh A, Robinson D, et al. De novo donor HLA-specific antibodies after heart transplantation are an independent predictor of poor patient survival. *Am J Transplant*. 2011;11(2).
32. Jansen MAA, Otten HG, De Weger RA, Huibers MMH. Immunological and fibrotic mechanisms in cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*. 2015 Dec;99(12):2467-75.
33. Clemmensen TS, Hjort Baatrup J, Bjerre KP, Lichscheidt E, Nielsen PK, Eiskjaer H. Routine screening for HLA Antibodies in Heart Transplant patients—Does it affect clinical decision making? *Clin Transplant*. 2024;38(3).
34. Hiemann NE, Meyer R, Wellnhofer E, Schoenemann C, Heidecke H, Lachmann N, et al. Non-HLA antibodies targeting vascular receptors enhance alloimmune response and microvasculopathy after heart transplantation. *Transplantation*. 2012;94(9).
35. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res*. 2006 Oct 13;99(8):801-15.
36. Valantine HA. The Role of Viruses in Cardiac Allograft Vasculopathy. *Am J Transplant*. 2004 Feb;4(2):169-77.



37. Goekler J, Zuckermann A, Kaider A, Angleitner P, Osorio-Jaramillo E, Moayedifar R, et al. Diminished impact of cytomegalovirus infection on graft vasculopathy development in the antiviral prophylaxis era – a retrospective study. *Transpl Int*. 2018;31(8).
38. Isobe M, Kosuge H, Suzuki JI. T cell costimulation in the development of cardiac allograft vasculopathy: Potential targets for therapeutic interventions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jul;26(7):1447-56.
39. Habal M V., Miller AMI, Rao S, Lin S, Obradovic A, Khosravi-Maharlooei M, et al. T cell repertoire analysis suggests a prominent bystander response in human cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant*. 2021;21(4).
40. Szeto WY, Krasinskas AM, Kreisel D, Krupnick AS, Popma SH, Rosengard BR. Depletion of recipient CD4+ but not CD8+ T lymphocytes prevents the development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*. 2002;73(7).
41. Zhao DXM, Hu Y, Miller GG, Luster AD, Mitchell RN, Libby P. Differential Expression of the IFN- $\gamma$ -Inducible CXCR3-Binding Chemokines, IFN-Inducible Protein 10, Monokine Induced by IFN, and IFN-Inducible T Cell  $\alpha$  Chemoattractant in Human Cardiac Allografts: Association with Cardiac Allograft Vasculopathy and Acute Rejection. *J Immunol*. 2002;169(3).
42. Nagano H, Libby P, Taylor MK, Hasegawa S, Stinn JL, Becker G, et al. Coronary arteriosclerosis after T-cell-mediated injury in transplanted mouse hearts: Role of interferon- $\gamma$ . *Am J Pathol*. 1998;152(5).
43. Hagemeyer MC, Van Oosterhout MFM, Van Wichen DF, Van Kuik J, Siera-De Koning E, Gmelig Meyling FHJ, et al. T cells in cardiac allograft vasculopathy are skewed to memory Th-1 cells in the presence of a distinct Th-2 population. *Am J Transplant*. 2008;8(5).
44. Van Loosdregt J, Van Oosterhout MFM, Bruggink AH, Van Wichen DF, Van Kuik J, De Koning E, et al. The chemokine and chemokine receptor profile of infiltrating cells in the wall of arteries with cardiac allograft vasculopathy is indicative of a memory T-helper 1 response. *Circulation*. 2006;114(15).
45. Young JB, Windsor NT, Kleiman NS, Lowry R, Cocanougher B, Lawrence EC. The relationship of soluble interleukin-2 receptor levels to allograft arteriopathy after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1992;11(3 II).
46. Alyaydin E, Welp H, Pistulli R, Dell Aquila A, Sindermann J, Tuleta I, et al. Immunological monitoring in cardiac allograft vasculopathy. *Eur Heart J*. 2021;42(Supplement\_1).
47. Aleksova N, So DYF, Stadnick E, Mielniczuk LM, Chih S. Increased platelet reactivity after heart transplantation. *Transplant Rep*. 2020;5(2).

48. De Lorgeril M, Dureau G, Boissonnat P, Ovize M, Monnez C, Monjaud I, et al. Increased platelet aggregation after heart transplantation: Influence of aspirin. *J Heart Lung Transplant*. 1991 Jul-Aug;10(4):600-3.
49. Bjerre KP, Berg K, Clemmensen TS, Poulsen SH, Kristensen SD, Hvas A, et al. Increased Platelet Aggregation in Heart Transplant Recipients with Cardiac Allograft Vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2019;38(4).
50. Bjerre KP, Clemmensen TS, Berg K, Poulsen SH, Hvas AM, Grove EL, et al. Platelet aggregation and response to aspirin therapy in cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2020;39(4).
51. Pollack A, Nazif T, Mancini D, Weisz G. Detection and imaging of cardiac allograft vasculopathy. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013 May;6(5):613-23.
52. Matsuo Y, Cassar A, Yoshino S, Flammer AJ, Li J, Gulati R, et al. Attenuation of cardiac allograft vasculopathy by sirolimus: Relationship to time interval after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32(8).
53. Tsutsui H, Ziada KM, Schoenhagen P, Iyisoy A, Magyar WA, Crowe TD, et al. Lumen loss in transplant coronary artery disease is a biphasic process involving early intimal thickening and late constrictive remodeling: Results from a 5-year serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2001;104(6).
54. Lim TT, Liang DH, Botas J, Schroeder JS, Oesterle SN, Yeung AC. Role of compensatory enlargement and shrinkage in transplant coronary artery disease: Serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 1997;95(4).
55. Pethig K, Heublein B, Wahlers T, Haverich A. Mechanism of luminal narrowing in cardiac allograft vasculopathy: Inadequate vascular remodeling rather than intimal hyperplasia is the major predictor of coronary artery stenosis. *Am Heart J*. 1998;135(4).
56. Atkinson C, Horsley J, Rhind-Tutt S, Charman S, Phillipotts CJ, Wallwork J, et al. Neointimal smooth muscle cells in human cardiac allograft coronary artery vasculopathy are of donor origin. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23(4).
57. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, Johnson JA, Yeatman L, Wang XM, et al. Effect of Pravastatin on Outcomes after Cardiac Transplantation. *N Engl J Med*. 1995;333(10).
58. Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, Von Scheidt W, Steinbeck G, et al. Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: A four-year randomized trial. *Circulation*. 1997;96(5).
59. Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, Spratt P, Galbraith A, O'Driscoll G, et al. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents

- coronary artery disease at 2 years: A randomized clinical trial. *Circulation*. 2004;110(17).
60. Kobashigawa JA, Pauly DF, Starling RC, Eisen H, Ross H, Wang SS, et al. Cardiac allograft vasculopathy by intravascular ultrasound in heart transplant patients. Substudy from the everolimus versus mycophenolate mofetil randomized, multicenter trial. *JACC Heart Fail*. 2013;1(5).
  61. Arora S, Andreassen AK, Karason K, Gustafsson F, Eiskjær H, Bøtker HE, et al. Effect of Everolimus Initiation and Calcineurin Inhibitor Elimination on Cardiac Allograft Vasculopathy in De Novo Heart Transplant Recipients. *Circ Heart Fail*. 2018;11(9).
  62. Mancini D, Pinney S, Burkhoff D, LaManca J, Itescu S, Burke E, et al. Use of rapamycin slows progression of cardiac transplantation vasculopathy. *Circulation*. 2003;108(1).
  63. Vallakati A, Reddy S, Dunlap ME, Taylor DO. Impact of Statin Use After Heart Transplantation: A Meta-Analysis. *Circ Heart Fail*. 2016;9(10).
  64. Schroeder JS, Gao SZ, Alderman EL, Hunt SA, Johnstone I, Boothroyd DB, Wiederhold V, Stinson EB. A preliminary study of diltiazem in the prevention of coronary artery disease in heart-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1993 Jan 21;328(3):164-70.
  65. Mehra MR, Ventura HO, Smart FW, Collins TJ, Ramee SR, Stapleton DD. An intravascular ultrasound study of the influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors and calcium entry blockers on the development of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Cardiol*. 1995;75(12).
  66. Eisen HJ, Hankins S, Wang D. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors for Cardiac Allograft Vasculopathy After Heart Transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Jun 13;69(23):2842-2844.
  67. Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D, et al. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: A randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9312).
  68. Kobashigawa JA, Moriguchi JD, Laks H, Wener L, Hage A, Hamilton MA, et al. Ten-year follow-up of a randomized trial of pravastatin in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(11).
  69. Katznelson S, Wang XM, Chia D, Ozawa M, Zhong HP, Hirata M, et al. The inhibitory effects of pravastatin on natural killer cell activity in vivo and on cytotoxic T lymphocyte activity in vitro. *J Heart Lung Transplant*. 1998;17(4).

70. Weis M, Pehlivanli S, Meiser BM, Von Scheidt W. Simvastatin treatment is associated with improvement in coronary endothelial function and decreased cytokine activation in patients after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(3).
71. Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg*. 2005 Aug;48(4):319–27.
72. Asleh R, Briasoulis A, Pereira NL, Boilson BA, Edwards BS, Adigun R, et al. Timing of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor initiation and allograft vasculopathy progression and outcomes in heart transplant recipients. *ESC Heart Fail*. 2018;5(6).
73. Eisen HJ, Kobashigawa J, Keogh A, Bourge R, Renlund D, Mentzer R, et al. Three-year results of a randomized, double-blind, controlled trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(5).
74. Kobashigawa J, Miller L, Renlund D, Mentzer R, Alderman E, Bourge R, et al. A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. *Transplantation*. 1998;66(4).
75. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb S, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report - 2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34(10).
76. Zuckermann A, Osorio-Jamillio E, Aliabadi-Zuckermann AZ. MTOR inhibition and clinical transplantation: Heart. *Transplantation*. 2018 Feb;102(2S Suppl 1):S27-S29.
77. Fine NM, Kushwaha SS. Recent Advances in Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Use in Heart and Lung Transplantation. *Transplantation*. 2016 Dec;100(12):2558-2568.
78. Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor  $\beta$ -stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts. *Transplant Proc*. 1991 Dec;23(6):2833-6.
79. Schmid C, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. Rapamycin inhibits transplant vasculopathy in long-surviving rat heart allografts. *Transplantation*. 1995;60(7).
80. Jennings DL, Lange N, Shullo M, Latif F, Restaino S, Topkara VK, et al. Outcomes associated with mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors in heart transplant recipients: A meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2018;265.
81. Viganò M, Tuzcu M, Benza R, Boissonnat P, Haverich A, Hill J, et al. Prevention of Acute Rejection and Allograft Vasculopathy by Everolimus in Cardiac Transplants Recipients: A 24-Month Analysis. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(6).

82. Asleh R, Briasoulis A, Kremers WK, Adigun R, Boilson BA, Pereira NL, et al. Long-Term Sirolimus for Primary Immunosuppression in Heart Transplant Recipients. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(6).
83. Raichlin E, Bae JH, Khalpey Z, Edwards BS, Kremers WK, Clavell AL, et al. Conversion to sirolimus as primary immunosuppression attenuates the progression of allograft vasculopathy after cardiac transplantation. *Circulation*. 2007;116(23).
84. Masetti M, Potena L, Nardoza M, Prestinenzi P, Taglieri N, Saia F, et al. Differential effect of everolimus on progression of early and late cardiac allograft vasculopathy in current clinical practice. *Am J Transplant*. 2013;13(5).
85. Topilsky Y, Hasin T, Raichlin E, Boilson BA, Schirger JA, Pereira NL, et al. Sirolimus as primary immunosuppression attenuates allograft vasculopathy with improved late survival and decreased cardiac events after cardiac transplantation. *Circulation*. 2012;125(5).
86. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valentine-von Kaeppler HA, et al. Everolimus for the Prevention of Allograft Rejection and Vasculopathy in Cardiac-Transplant Recipients. *N Engl J Med*. 2003;349(9).
87. Hiatt WR, Nissen SE. New drug application 21-628, certican (Everolimus), for the proposed indication of prophylaxis of rejection in heart transplantation: Report from the cardiovascular and renal drugs advisory committee, US food and drug administration, November 16, 2005, Rockville, Md. *Circulation*. 2006 Mar 14;113(10):e394-5.
88. Podder H, Stepkowski SM, Napoli KL, Clark J, Verani RR, Chou TC, et al. Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(5).
89. Hunt J, Bedánová H, Starling RC, Rabágo G, Banner NR, Kobashigawa J, et al. 398: Premature termination of a prospective, open label, randomized, multicenter study of sirolimus to replace calcineurin inhibitors (CNI) in a standard care regimen of CNI, MMF and corticosteroids early after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(2).
90. Eisen HJ, Kobashigawa J, Starling RC, Pauly DF, Kfoury A, Ross H, et al. Everolimus versus mycophenolate mofetil in heart transplantation: A randomized, multicenter trial. *Am J Transplant*. 2013;13(5).
91. Andreassen AK, Andersson B, Gustafsson F, Eiskjær H, Gude E, Jansson K, et al. Everolimus initiation and early calcineurin inhibitor withdrawal in heart transplant recipients: A randomized trial. *Am J Transplant*. 2014;14(8).
92. Andreassen AK, Andersson B, Gustafsson F, Eiskjær H, Rådegran G, Gude E, et al. Everolimus Initiation with Early Calcineurin Inhibitor Withdrawal in de Novo Heart

- Transplant Recipients: Three-Year Results from the Randomized SCHEDULE Study. *Am J Transplant*. 2016;16(4).
93. Potena L, Pellegrini C, Grigioni F, Amarelli C, Livi U, MacCherini M, et al. Optimizing the Safety Profile of Everolimus by Delayed Initiation in de Novo Heart Transplant Recipients: Results of the Prospective Randomized Study EVERHEART. *Transplantation*. 2018;102(3).
  94. Peled Y, Lavee J, Raichlin E, Katz M, Arad M, Kassif Y, et al. Early aspirin initiation following heart transplantation is associated with reduced risk of allograft vasculopathy during long-term follow-up. *Clin Transplant*. 2017;31(12).
  95. Kim M, Bergmark BA, Zelniker TA, Mehra MR, Stewart GC, Page DS, et al. Early aspirin use and the development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36(12).
  96. Aleksova N, Brahmhatt DH, Kiamanesh O, Petropoulos JA, Chang Y, Guyatt G, et al. The effect of antiplatelet therapy on survival and cardiac allograft vasculopathy following heart transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Clin Transplant*. 2021;35(1).
  97. Bellumkonda L, Oikonomou EK, Hsueh C, Maulion C, Testani J, Patel J. The impact of induction therapy on mortality and treated rejection in cardiac transplantation: A retrospective study. *J Heart Lung Transplant*. 2022;41(4).
  98. Aliabadi A, Grömmmer M, Cochrane A, Salameh O, Zuckermann A. Induction therapy in heart transplantation: Where are we now? *Transpl Int*. 2013 Jul;26(7):684-95.
  99. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Dipchand AI, Benden C, Christie JD, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: Thirtieth official adult heart transplant report - 2013; Focus theme: Age. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32(10).
  100. Carrier M, White M, Perrault LP, Pelletier GB, Pellerin M, Robitaille D, et al. A 10-year experience with intravenous thymoglobuline in induction of immunosuppression following heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18(12).
  101. Lamich R, Ballester M, Martí V, Brossa V, Aymat R, Carrió I, et al. Efficacy of augmented immunosuppressive therapy for early vasculopathy in heart transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(2).
  102. Zuckermann A, Schulz U, Deuse T, Ruhpawar A, Schmitto JD, Beiras-Fernandez A, et al. Thymoglobulin induction in heart transplantation: Patient selection and implications for maintenance immunosuppression. *Transpl Int*. 2015 Mar;28(3):259-69.

103. Ruan V, Czer LSC, Awad M, Kittleson M, Patel J, Arabia F, et al. Use of Anti-Thymocyte Globulin for Induction Therapy in Cardiac Transplantation: A Review. *Transplant Proc.* 2017;49(2).
104. Barten MJ, Schulz U, Beiras-Fernandez A, Berchtold-Herz M, Boeken U, Garbade J, et al. A Proposal for Early Dosing Regimens in Heart Transplant Patients Receiving Thymoglobulin and Calcineurin Inhibition. *Transplant Direct.* 2016 May 20;2(6):e81.
105. Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, Heymanns J, Radsak K, Sprenger H, et al. Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation.* 1997;64(10).
106. Kho MML, Bouvy AP, Cadogan M, Kraaijeveld R, Baan CC, Weimar W. The effect of low and ultra-low dosages Thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol.* 2012;26(4).
107. Prévaille X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, et al. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation.* 2001;71(3).
108. Kobashigawa JA, Kittleson M, Patel J, Aintablian T, Zarrini P, Lipson A, et al. Thymoglobulin Provides Protection Against Ischemia Reperfusion in the Immediate Post-Transplant Period. *J Heart Lung Transplant.* 2016;35(4).
109. Mourad G, Morelon E, Noël C, Glotz D, Lebranchu Y. The role of Thymoglobulin induction in kidney transplantation: *Clin Transplant.* 2012;26(5):E450-64.
110. Mohty M, Bacigalupo A, Saliba F, Zuckermann A, Morelon E, Lebranchu Y. New directions for rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin®) in solid organ transplants, stem cell transplants and autoimmunity. *Drugs.* 2014;74(14):1605-34.
111. Zuckermann A, Ploner M, Czerny M, Uenal K, Birsan T, Grimm M, et al. Low incidence of graft arteriosclerosis after cardiac transplantation - risk factor analysis for patients with induction therapy. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20(2).
112. Bonaros N, Dunkler D, Kocher A, Imhof M, Grimm M, Zuckermann A, et al. Ten-year Follow-up of a Prospective, Randomized Trial of BT563/BB10 Versus Anti-thymocyte Globulin as Induction Therapy After Heart Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2006;25(9).
113. Zhang R, Haverich A, Strüber M, Simon A, Bara C. Delayed Onset of Cardiac Allograft Vasculopathy by Induction Therapy Using Anti-thymocyte Globulin. *J Heart Lung Transplant.* 2008;27(6).
114. Kugathasan L, Wang SM, Rodenas-Alesina E, Orchanian-Cheff A, Kozuszko S, Demas-Clarke P, et al. Induction Therapy in Heart Transplantation: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *J Heart Lung Transplant.* 2022;41(4).

115. Foroutan F, Guyatt G, Stehlik J, Gustafsson F, Greig D, McDonald M, et al. Use of induction therapy post-heart transplantation: Clinical practice recommendations based on systematic review and network meta-analysis of evidence. *Clin Transplant*. 2024;38(3).
116. Nagji AS, Hranjec T, Swenson BR, Kern JA, Bergin JD, Jones DR, et al. Donor Age Is Associated With Chronic Allograft Vasculopathy After Adult Heart Transplantation: Implications for Donor Allocation. *Ann Thorac Surg*. 2010;90(1).
117. Ciubotariu R, Liu Z, Colovai AI, Ho E, Itescu S, Ravalli S, et al. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. *J Clin Invest*. 1998;101(2).
118. Carrier M, Leblanc MH, Perrault LP, White M, Doyle D, Beaudoin D, et al. Basiliximab and Rabbit Anti-thymocyte Globulin for Prophylaxis of Acute Rejection After Heart Transplantation: A Non-inferiority Trial. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(3).
119. Briasoulis A, Inampudi C, Pala M, Asleh R, Alvarez P, Bhama J. Induction immunosuppressive therapy in cardiac transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Heart Fail Rev*. 2018 Sep;23(5):641-649.
120. Hognestad A, Michelsen A, Brosstad F, Damås JK, Holm T, Simonsen S, et al. Platelet activation in heart transplant recipients. *Clin Transplant*. 2004;18(2).
121. de Lorgeril M, Loire R, Guidollet J, Boissonnat P, Dureau G, Renaud S. Accelerated coronary artery disease after heart transplantation: the role of enhanced platelet aggregation and thrombosis. *J Intern Med*. 1993 Apr;233(4):343-50.
122. De Lorgeril M, Dureau G, Boissonnat P, Guidollet J, Juhan-Vague I, Bizollon C, et al. Platelet function and composition in heart transplant recipients compared with nontransplanted coronary patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1992;12(2).
123. Gaber AO, Monaco AP, Russell JA, Lebranchu Y, Mohty M. Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin®): 25 Years and new frontiers in solid organ transplantation and haematology. *Drugs*. 2010 Apr 16;70(6):691-732.
124. Di Filippo S, Boissonnat P, Sassolas F, Robin J, Ninet J, Champsaur G, et al. Rabbit antithymocyte globulin as induction immunotherapy in pediatric heart transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3).



## 10. Životopis

Marija Doronjga rođena je 25. rujna 1998. godine u Zagrebu gdje je završila V. gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2018. godine. Nagrađena je Dekanovom nagradom za najbolju studenticu u akademskoj godini 2020./2021. Tijekom studija, radila je kao student demonstrator na katedrama za internu medicinu i pedijatriju. Kao studentica, aktivno je sudjelovala na nekoliko međunarodnih kongresa i simpozija, također i u aktivnostima studentskih sekcija. S posterom "*A large coronary-pulmonary fistula and coronary artery disease – surgical approach*" sudjelovala je na Open Medical Institute Cleveland Clinic Satellite Symposium in Cardiac Surgery 2023. godine. Sa sažetkom "*Fulminant Influenza B myocarditis presenting with cardiogenic shock*" sudjelovala je na 2. International Conference on Extracorporeal Organ Support (ICEOS) 2024. godine. Također je sudjelovala na 3. nacionalnom kongresu Hrvatskoga društva za kardijalnu kirurgiju s posterom "*How To Manage the Aortic Root Aneurysm in a 3-year-old Child With Neonatal Marfan syndrome?*".