

Д. Ю. Ефимов, А. В. Носик, Г. В. Жук, С. В. Коротков,
А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо

МЕХАНИЗМЫ И ОЦЕНКА АЛЛОРЕАКТИВНОСТИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

*РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе
УЗ «9-я городская клиническая больница», г. Минск*

Трансплантация печени является эффективным и единственным методом лечения хронических заболеваний печени в терминальной стадии, острой печеночной недостаточности и некоторых опухолевых заболеваний. При этом, госпитальная летальность после данного хирургического вмешательства не превышает 4–14%, а доля пациентов проживших после пересадки печени более 10 лет составляет от 50 до 70%. Несмотря на разработку новых иммуносупрессивных препаратов, вплоть до 40–60% реципиентов переносят один или более эпизодов острого отторжения. При этом у других пациентов существует вероятность подвергнуться гипериммуносупрессии, что может привести к развитию побочных эффектов, в первую очередь токсичности и инфекционных осложнений. В данной статье проанализирован опыт ведущих трансплант-центров в диагностике, лечении и оценке риска данного осложнения. Изложена современная концепция патогенеза иммунологического конфликта между реципиентом и печеночным графтом. Очерчены основные методы мониторинга иммунологического статуса реципиента и перспективы развития данного направления.

Ключевые слова: трансплантация печени, иммунный ответ, иммунологическая реактивность реципиента.

**D. Y. Efimov, A. V. Nosik, H. V. Zhuk, S. V. Korotkov,
A. M. Dzyadzko, A. E. Shcherba, O. O. Rummo**

MECHANISMS AND ASSESSMENT OF ALLOREACTIVITY AFTER LIVER TRANSPLANTATION

Liver transplantation is the treatment method of choice in case of decompensated chronic liver disease, fulminant hepatic failure and some liver tumors with inhospital mortality rate 4–14% and 10 year recipients' survival rate 50–70%. Despite of development of new immunosuppressive drugs acute rejection (AR) after liver transplantation is one of the most frequent complication following this procedure and till 40–60% of recipients have been suffering at least one AR episode. Moreover high risk of hyperimmunosuppression and side effects (toxicity and infectious complications) development exists. That's why the real necessity of development of non-invasive biomarkers and predictors of AR exists. In this article the experience of the leading transplant centers in the diagnosis, treatment and evaluation of the risk of this complication has been analyzed. It describes the modern concept of the pathogenesis of immunological conflict between the recipient and the liver graft. It outlines the basic methods of monitoring the recipient's immunological status and prospects of development of this scientific direction.

Key words: liver transplantation, immune response, immunologic reactivity of recipient.

Отторжение трансплантата печени в зависимости от времени возникновения, гистологических характеристик и обратимости классифицирует как острое и хроническое. Термин «острое отторжение трансплантата печени» гистологически характеризуется триадой Сновера: эндотелиит, негнойный деструктивный холангит и воспалительная инфильтрация портальных трактов [1–4]. В свою очередь, хроническое отторжение может рассматриваться как итог нескольких эпизодов острого отторжения, сопровождающееся прогрессирующей деструкцией и снижением количества интралобулярных и септальных желчных протоков (дуктопения) в ассоциации с выраженным воспалительным ответом. Более того,

интимальный и субинтимальный воспалительный процесс в печеночных артериях второго и третьего порядка приводит к облитерирующему эндартерииту и ишемии гепатоцитов зоны 3 и желчевыводящих протоков [5, 6]. У 8–13% реципиентов печеночного графта, перенесших острое отторжение, в дальнейшем развивается хроническое дуктопеническое отторжение, которое в конечном итоге требует выполнения ретрансплантации [7–8].

Роль врожденного и приобретенного иммунитета в развитии отторжения

В развитии иммунологического конфликта между реципиентом и донорским органом принимают участие

две принципиально разные системы – врожденный антиген не зависимый и приобретенный антиген специфичный иммунный ответ. Антиген зависимый иммунный ответ на генетически чужеродный орган является ключевым патогенетическим звеном реакции отторжения трансплантата, при этом, Т-лимфоциты – это основной тип клеток, ответственный за его развитие [9–11]. Антиген независимая иммунологическая реакция развивается вследствие активации врожденного иммунитета в ответ на повреждение графта во время холодовой консервации и последующей реперфузии (ишемически-реперфузионное повреждение, ИРП) и происходит вне зависимости от того, является орган генетически чужеродным или нет. Повреждение и онкотический некроз гепатоцитов и синусоидальных эндотелиоцитов во время ИРП приводит к высвобождению большого количества внутриклеточных молекул, которые в норме не попадают в межклеточное пространство и которые способны индуцировать стерильный воспалительный ответ [12–15]. Такие внутриклеточные молекулы, маркеры тканевого повреждения или повреждение ассоциированные молекулярные паттерны (damage-associated molecular patterns, DAMPs), включают в себя ядерный белок HMGB-1 (high-mobility group box 1), белки теплового шока, гистоны, фрагменты ДНК, АТФ и мочевую кислоту. Клетки системы врожденного иммунитета экспрессируют функционально не изменяющиеся паттерны распознающие рецепторы (ПР-рецепторы), которые позволяют им акцептировать не только патоген ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), но и DAMPs. При взаимодействии повреждение ассоциированных молекулярных паттернов с ПР-рецепторами происходит амплификация транскрипции генов провоспалительных цитокинов, выраженная стимуляция инфламмосомы, активация системы комплемента, что в конечном итоге приводит к стойкому воспалительному ответу. Важно отметить, что врожденный иммунный ответ, активированный DAMPs, стимулирует миграцию донорских антиген-презентирующих клеток в периферическую лимфатическую систему реципиента, что является ко-стимулятором приобретенного иммунного ответа [16–19].

Аллорекогниция

Первым этапом в активации приобретенного иммунитета реципиента является распознавание Т-лимфоцитом аллоантигена или аллорекогниция. Трансплантация печени является уникальной иммунологической ситуацией, при которой активация Т-лимфоцитов реципиента донорскими антигенами может осуществляться тремя различными путями. Прямое распознавание – это взаимодействие Т-клеточного рецептора реципиента (T-cell receptor, TCR) с сочетанием аллогенного главного комплекса гистосовместимости (МНС) и пептида, презентированными донорскими дендроцитами. Непрямое распознавание происходит, когда фрагменты главного и минорного комплексов гистосовместимости донора процессируются и представляют антиген презентирющими клетками (АПК) реципиента [20–24]. Также выделяют третий тип, смешанное или полупрямое распознавание, суть которого заключается в захвате комплекса МНС и пептида АПК реципиента. В целом, обмен фрагментами клеточной мембраны между взаимодей-

ствующими друг с другом клетками является хорошо описанным феноменом в клеточной биологии, а в контексте иммунного ответа реципиента на аллографт, перенос фрагмента мембраны, содержащий интактный МНС донора, на АПК реципиента приводит в конечном итоге к презентированию и полупрямому распознаванию аллоантигена Т-лимфоцитами [25–29].

Роль HLA-системы в отторжении трансплантата печени

Важно выделить роль различных классов HLA (human leukocyte antigens) в развитии отторжения трансплантата печени. Так, распределение HLA-антигенов в печеночном аллографте коррелирует с гистологическими характеристиками острого отторжения. Было показано, что вследствие того, что гепатоциты экспрессируют только HLA первого класса, «чистая» культура гепатоцитов не вызывает иммунного ответа, в то время как добавление АПК в клеточную культуру стимулирует цитолитическую иммунную реакцию. Основная мишень при развитии отторжения трансплантата – клетки, обильно экспрессирующие HLA и первого, и второго класса, – билиарные эпителиоциты и сосудистые эндотелиоциты [30–32]. Поэтому воспалительная реакция, наблюдающаяся при остром отторжении, локализована в портальных трактах и представлена в виде поврежденного эпителия желчных протоков и венозного эндотелия. При этом, лабораторно это повреждение проявляется повышением уровней щелочной фосфатазы (ЩФ) и гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП). Для эпителиоцитов желчных протоков и сосудистых эндотелиоцитов характерно прямое распознавание (за счет наличия второго класса HLA), в то время как для гепатоцитов непрямое. При этом, непосредственное повреждение и воспалительная инфильтрация гепатоцитов ограничена перипортальной зоной [33–35]. Это говорит в целом о меньшей иммуногенности гепатоцитов в сравнении с эпителиальной выстилкой желчных протоков и сосудистым эндотелием, что объясняется более интенсивной экспрессией HLA первого класса и наличием HLA второго класса на мембранах эндотелиоцитов, а также присутствие молекул клеточной адгезии. Роль HLA-совместимости широко показана и обоснована при трансплантации почки и сердца, однако роль HLA-типирования и подбора донора и реципиента при трансплантации печени остается противоречивой [36–39]. При этом было показано, что несоответствие по HLA-антигенам не влияет на выживаемость графта, но ассоциировано с большей частотой острого отторжения.

Ко-стимуляция Т-лимфоцитов

В результате процесса аллорекогниции антигены донора взаимодействуют с TCR-CD3 комплексом (первый сигнал). Однако сигнала, поступающего в Т-лимфоцит через TCR-CD3 не достаточно для активации. Вторым необходимым сигналом является взаимодействие ко-стимуляторных молекул на мембране Т-лимфоцита с их лигандами, которые экспрессированы на антиген презентирющих клетках. Принципиально ко-стимуляторные молекулы классифицируются на два подсемейства: семейство рецепторов В7, к которому относятся CD28 и CD152 (CTLA 4), и семейство рецепторов фактора не-

кроза опухолей (ФНО-Р), для которой примером лиганд-рецептор являются CD40 и CD154 (CD40L) [5, 7, 11, 23–25].

Молекулы CD 28 постоянно экспрессированы на Т-лимфоцитах, и их лигандами являются CD80/CD86 антиген презентующих клеток. Стимуляция CD28 повышает стабильность иРНК интерлейкина-2 (ИЛ-2), понижает порог активации, способствует пролиферации и резистентности к апоптозу Т-лимфоцитов. Еще одной важной функцией молекул CD28 является содействие экспрессии CD154 (CD40L), лигандом которой является CD40 АПК и В-лимфоцитов. Взаимодействие CD40 и CD154 в свою очередь способствуют активации молекул семейства B7, и таким образом, происходит усиление (амплификация) активации Т-лимфоцитов и иммунного ответа [4, 7, 13, 16, 40].

При этом на протяжении иммунного ответа активированные Т-лимфоциты содействуют экспрессии CD152 (CTLA-4), ко-стимуляторной молекуле гомологичной CD28, лигандами которой также являются CD80/CD86. Но связывающая способность CD152 в 10-20 раз больше, чем у CD28. Рецепторы CD152 конкурируют с CD28 за связывание CD80/CD86 АПК и ослабляют выраженность иммунного ответа. Было показано, что мыши, с заблокированным геном CD152, погибают от массивной пролиферации лимфоцитов в ответ на взаимодействие с антигенами окружающей среды [41–43].

Концепция «трех сигналов» в активации Т-лимфоцита

Связывание комплекса МНС-пептид с TCR-CD3 (первый сигнал) параллельно со взаимодействием ко-стимуляторных молекул с их лигандами (второй сигнал) приводит к формированию иммунологического синапса, адгезии АПК и Т-лимфоцита, перестройке клеточных мембран, интеграции комплекса TCR-МНС-пептид в билипидный слой мембраны Т-лимфоцита, что в конечном итоге приводит к фосфорилированию определенных внутриклеточных сигнальных молекул (таких как инозитол-трифосфат (ИТФ) и диацилглицерол (ДАГ)). ИТФ взаимодействует с кальциевыми каналами эндоплазматического ретикулаума (ЭПР), что приводит к высвобождению ионов кальция, который активирует фосфатазу кальциневрин, которая в свою очередь, дефосфорилируя ядерный фактор транскрипции NFAT (nuclear factor of activated T-cells), позволяет ему транслоцироваться в ядро и активировать транскрипцию большинства провоспалительных цитокинов (в том числе и фактор роста Т-лимфоцитов или интерлейкин-2, ИЛ-2) [5, 8, 9, 15, 18, 21, 25]. ДАГ стимулирует сигнальный путь ядерного фактора NF-κB, при котором последний высвобождается от ингибиторного белка IκB путем его фосфорилирования IκB-киназой, транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию генов ряда цитокинов и факторов роста. Активация транскрипции приводит к синтезу значительного количества провоспалительных цитокинов (в том числе и ИЛ-2), которые, действуя ауто- и паракринно (в том числе и через CD25 – рецептор к ИЛ-2), инициируют пролиферацию, клональную экспансию и дифференцировку активированных Т-лимфоцитов. Необходимость параллельного взаимодействия комплекса МНС-пептид с TCR-CD3 (первый сигнал) и ко-стимуляторных молекул с их лигандами

(второй сигнал), которое в конечном итоге приводит к синтезу ИЛ-2 (фактора роста Т-лимфоцитов – третий сигнал), и носит название феномена «трех сигналов» в активации Т-лимфоцита. При этом, именно на блокирование передачи данных сигналов и направлена существующая базисная иммуносупрессивная терапия: циклоспорин и такролимус блокируют кальциневрин, микофенолата мофетил и глюкокортикостероиды ингибируют внутриядерные процессы транскрипции, а базиликсимаб, моноклональные антитела CD25, не позволяют ИЛ-2 стимулировать пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов [41–46].

Клинические проявления и особенности диагностики отторжения трансплантата печени

В большинстве случаев острое отторжение трансплантата печени протекает как бессимптомный сдвиг биохимических показателей, которые предшествуют клиническому проявлению холестатического воспаления, поражающего билиарный эпителий, портальный эндотелий и гепатоциты. Повышение билирубина, щелочной фосфатазы и γ-глутамилтрансферазы является первоначальным маркером, вслед за которым повышаются и уровни трансаминаз. «Ферментные» показатели обладают высокой чувствительностью как биомаркеры повреждения трансплантата, но их специфичность крайне мала. Изменения в биохимическом анализе крови могут быть вызваны как иммунологическим конфликтом, так и другими причинами, такими как: билиарные стриктуры, тромбоз печеночной артерии, лекарственной токсичностью, реактивацией вирусного гепатита в печеночном графте и другими [33, 36, 39, 43, 47].

Клинические проявления острого отторжения трансплантата не специфичны и включают в себя общую слабость, повышенную утомляемость, недомогание, боли в животе без четкой локализации, субфебрильную лихорадку, снижение продукции желчи, нарастание асцита и увеличение трансплантата в размере [25, 29, 33, 38].

Биопсия печеночного графта является золотым стандартом дифференциальной диагностики различных осложнений, возникающих после трансплантации печени. Морфологическое исследование обладает высокой чувствительностью и специфичностью, но обладает серьезными недостатками. Во-первых, это инвазивное вмешательство, сопровождающееся в ряде случаев осложнениями. Во-вторых, трактовка полученных результатов (например, дифференциальная диагностика отторжения и реактивации гепатита С) требует времени, дополнительных методов окраски и в ряде случаев остается неоднозначной. Учитывая вышесказанное, в настоящее время активно ведется научный поиск не инвазивных методов, позволяющих прогнозировать иммунореактивность и выявлять отторжение на начальном этапе иммунного ответа [48–50].

Отторжение является иммунологической реакцией на алло-МНС молекулы, поэтому логичными является мониторинг иммунологического статуса реципиента в послетрансплантационном периоде. Иммунологический мониторинг включает в себя методы, разделяющиеся на антиген-специфические исследования, антиген-неспецифические исследования и методы прогнозирования толерантность (таблица 1) [28–30, 36, 39, 41–43].

Одним из антиген-специфических методов является метод постановки реакции смешанных лимфоцитов, который используется для оценки клеточного иммунитета. Совместное культивирование молекул, несущих МНС II класса, приводит к бласт-трансформации и пролиферации. Для оценки реактивности индивидуума к аллельному варианту МНС готовят однонаправленную культуру смешанных лимфоцитов. При данном варианте клетки донора облучаются или обрабатываются митомицином, что позволяет сохранить жизнеспособность клеток, но исключает их пролиферацию. Данные клетки – стимуляторы, смешиваются с лимфоцитами реципиента и совместно культивируются в течение 3–5 суток. После чего результаты оценивают с помощью морфологического или радиоизотопного метода. Чаще применяется оценка Н-тимидина, который поглощают пролиферирующие клетки. Степень пролиферации прямо пропорционально коррелирует с иммунореактивностью к трансплантату [41–43, 51].

Методом иммуноферментных пятен определяется количество Т клеток, которые реагируют на аллоантигены выработкой цитокинов *in vivo*. Вначале на панели лунок фиксируют антитела к специфическим цитокинам. Добавляют Т лимфоциты реципиента, которые культивируются совместно со стимулирующими антигенами донора в оптимальных условиях. Затем лунки тщательно отмывают от клеток. Участки накопления секреторных молекул проявляют, добавляя связанные с ферментом антитела. Образовавшиеся пятна подсчитывают, определяя количество активированных клеток. Исследование данным методом уровня интерферона определяет уровень иммунного ответа к печеночному трансплантату. Недостатками метода является необходимость клеток донора, трудоемкость и длительность [42–47].

Смешанный химеризм – ареактивное присутствие в организме реципиента как собственных, так и донорских лимфоцитов. Данное явление наблюдается при совместной трансплантации печени и гемопоэтических

клеток. Персистенция клеток донора может выявляться через несколько лет после трансплантации. Гипотетически определение химеризма должно свидетельствовать о толерантном состоянии, но мета-анализ не установил корреляции между микрохимеризмом и отторжением. Выявление смешанного микрохимеризма проводится методом FISH или STR-ПЦР [48–51].

Наиболее известным методом антиген-неспецифического исследования является ImmuKnow. Суть метода заключается в подсчете количества аденозин трифосфата (АТФ) в CD4+ Т-лимфоцитах после стимуляции. Образцы цельной крови инкубируются со стимулятором (фитогемагглютинин) в течение 13–15 часов. После чего CD4+ клетки сепарируются с помощью намагниченных моноклональных антител. Далее проводят лизис CD4+ клеток и количественно оценивают уровень АТФ. Результат коррелирует со степенью реактивности Т-лимфоцитов при их активации [26, 28, 32–36, 51].

Потенциальным методом определения иммунного ответа является оценка уровня циркулирующих цитокинов в послетрансплантационном периоде. Однако не установлено точной корреляции между уровнем секреции и иммунореактивностью, что требует дальнейших исследований с целью оптимизации интерпретации результатов [48–51].

В оценке индукции толерантности большая роль уделяется определению пула CD4+CD25+Foxp3+Т-регуляторных клеток методом цитофлуометрии. В литературе продемонстрированы данные о явлениях острого отторжения у реципиентов со снижением количества Т-регуляторных клеток, напротив у реципиентов со спонтанной индукцией толерантности, определялось повышение пула в тканях трансплантата и периферической крови [49–51].

Дискуссия

Несмотря на разработку новых иммуносупрессивных препаратов, вплоть до 60% реципиентов переносят один и более эпизодов острого отторжения. При этом

Таблица. Современные методы определения иммунного статуса пациента после трансплантации печени

Группа методов	Название метода	Плюсы	Недостатки
Антиген-специфические	Смешанная культура лимфоцитов	Позволяет определить иммунореактивность к специфическому антигену <i>in vitro</i>	Требуются клетки лимфоидной ткани донора, длительность инкубирования
	ELISPOT	Позволяет определить количество цитокин-продуцирующих клеток и относительное количество цитокина на клетку	Требуются клетки лимфоидной ткани донора, трудоемко
	Определение микрохимеризма	Прогнозирует спонтанную толерантность	Трудоемко, требует валидации
Антиген-неспецифические	ImmuKnow	Исследует уровень общей реактивности CD4+ Т клеток	Противоречивые данные
	Определение уровня секретированных цитокинов	Доступно	Требует валидации
	Определение CD4+CD25+Foxp3+Т-лимфоцитов	Ассоциированы с отторжением	Требует валидации
Прогнозирование толерантности	Определение концентрации предсуществующих иммуноглобулинов и комплемента	Позволяет выявить толерантных пациентов	Трудоемко. Подходит для ограниченного количества пациентов
	Определение аллеля гена		
	Определение сдвигов баланса иммунокомпетентных клеток		

у других пациентов существует вероятность подвергнуться гипериммуносупрессии, что может привести к развитию побочных эффектов, в первую очередь токсичности и инфекционных осложнений. В большинстве мировых трансплант-центрах базисное мониторирование иммунного ответа реципиента основано на косвенных признаках и состоит из оценки биохимических тестов, уровня иммуносупрессантов в крови и клинического состояния пациента. Коммерчески доступных тестов определения глубины иммуносупрессии в настоящее время нет, а единственный известный (*Immuknow*) отличается дороговизной и непрактичностью. Было показано, что уровень иммуносупрессивного препарата в крови не коррелирует с его накоплением в трансплантате. В то же время биохимические тесты позволяют судить лишь о следствии повреждения паренхимы печеночного графта. Поэтому, для того, чтобы адекватно рассчитать глубину иммуносупрессии, уменьшить частоту побочных эффектов и улучшить показатели выживаемости и качества жизни пациентов после трансплантации существует необходимость в разработке с одной стороны предикторов развития отторжения трансплантата, а с другой – методики мониторирования иммунного ответа реципиента на генетически чужеродный орган. В то же время на настоящий момент не существует валидированного, стандартизованного и воспроизводимого метода оценки степени угнетения иммунной системы на фоне иммуносупрессии, несмотря на широкий спектр предложенных вариантов иммуномониторинга.

Реакция отторжения трансплантата печени является сложным и не до конца объясненным процессом, в который вовлечены как врожденное, так и приобретенное звено иммунитета. В связи с этим никакой единичный тест не может обеспечить полной картины иммунного ответа организма реципиента на генетически чужеродный материал. Также как и не существует лабораторных методик, которые бы заменили клиническое суждение опытного врача-трансплантолога о коррекции лечения. Тем не менее существует потребность в объективизации оценки иммунной функции и прогнозирования осложнений у пациентов, перенесших трансплантацию печени, путем разработки комплексного подхода на основании иммунологических и молекулярно-генетических методик.

Литература

1. *Shaked, A., Ghobrial R. M., Merion R. M. et al.* Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 2009;9(2):301–308.
2. *Snover, D. C., Sibley R. K., Freese D. K. et al.* Orthotopic liver transplantation: a pathological study of 63 serial liver biopsies from 17 patients with special reference to the diagnostic features and natural history of rejection. *Hepatology.* 1984;4(6):1212–1222.
3. *Ray, R. A., Lewin K. J., Colonna J. et al.* The role of liver biopsy in evaluating acute allograft dysfunction following liver transplantation: a clinical histologic correlation of 34 liver transplants. *Hum Pathol.* 1988;19(7):835–848.
4. *Ascher, N. L., Stock P. G., Bumgardner G. L. et al.* Infection and rejection of primary hepatic transplant in 93 consecutive patients treated with triple immunosuppressive therapy. *Surg Gynecol Obstet.* 1988;167(6):474–484.
5. *Fisher, L. R., Henley K. S., Lucey M. R.* Acute cellular rejection after liver transplantation: variability, morbidity, and mortality. *Liver Transpl Surg.* 1995;1(1):10–15.
6. *Demetris, A. J., Ruppert K., Dvorchik I. et al.* Real-time monitoring of acute liver-allograft rejection using the Banff schema. *Transplantation.* 2002;74(9):1290–1296.
7. *Seiler, C. A., Renner E. L., Czerniak A. et al.* Early acute cellular rejection: no effect on late hepatic allograft function in man. *Transpl Int.* 1999;12(3):195–201.
8. *Dousset, B., Conti F., Cherruau B. et al.* Is acute rejection deleterious to long-term liver allograft function? *J. Hepatol.* 1998;29(4):660–668.
9. *Demetris, A. J., Murase N., Ye Q. et al.* Analysis of chronic rejection and obliterative arteriopathy. Possible contributions of donor antigen-presenting cells and lymphatic disruption. *Am. J. Pathol.* 1997;150(2):563–578.
10. *Vierling, J. M.* Immunology of acute and chronic hepatic allograft rejection. *Liver Transpl Surg.* 1999;5(4 suppl 1):S1–S20.
11. *Germain, R. N.* MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 1994;76(2):287–299.
12. *Neuberger, J., Adams D.* What is the significance of acute liver allograft rejection? *Journal of Hepatology.* 1998;29:143.
13. *Adams, A. B., Williams M. A., Jones T. R. et al.* Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J. Clin. Invest.* 2003;111(12):1887–1895.
14. *Hubscher, S. G.* Histological findings in liver allograft rejection—new insights into the pathogenesis of hepatocellular damage in liver allografts. *Histopathology.* 1991;18(4):377–383.
15. *Martinez, O. M., Burke E. C., Alan T. J., Ascher N. L.* Allogeneic hepatocytes stimulate the production of immunoregulatory molecules in mixed lymphocyte hepatocyte cultures. *Transplant Proc.* 1991;23(1 Pt 1):805–806.
16. *Perrella, O., Sbriglia C., Arenga G. et al.* Acute rejection after liver transplantation: Is there a specific immunological pattern? *Transplant Proc.* 2006;38(10):3594–3596.
17. *Sun, Z., Wada T., Maemura K. et al.* Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl.* 2003;9(5):489–497.
18. *Li, J., Yang Y., Inoue H. et al.* The expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 in human carcinoma cell lines: its regulation by interferon gamma and interleukin-10. *Cancer Immunol Immunother.* 1996;43(4):213–219.
19. *Chen, Y., Chen J., Liu Z. et al.* Relationship between TH1/TH2 cytokines and immune tolerance in liver transplantation in rats. *Transplant Proc.* 2008;40(8):2691–2695.
20. *Bumgardner, G. L., Chen S., Almond P. S. et al.* Cell subsets responding to purified hepatocytes and evidence of indirect recognition of hepatocyte major histocompatibility complex class I antigen. II. In vitro-generated “memory” cells to class I+ class II- hepatocytes. *Transplantation.* 1992;53(4):863–868.
21. *Ramos, H. C., Reyes J., Abu-Elmagd K. et al.* Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients. *Transplantation.* 1995;59(2):212–217.
22. *Koshiba, T., Li Y., Takemura M. et al.* Clinical, immunological, and pathological aspects of operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation. *Transpl Immunol.* 2007;17(2): 94–97.
23. *Sakaguchi, S., Sakaguchi N., Asano M. et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995;155(3):1151–1164.
24. *Gavin, M. A., Rasmussen J. P., Fontenot J. D. et al.* Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 2007;445(7129):771–775.
25. *Li, Y., Zhao X., Cheng D. et al.* The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation.* 2008;86(12):1837–1843.
26. *Xie, L., Ichimaru N., Morita M. et al.* Identification of a novel biomarker gene set with sensitivity and specificity for distinguishing between allograft rejection and tolerance. *Liver Transpl.* 2012;18(4):444–454.
27. *Steinhoff, G., Wonigeit K., Pichlmayr R.* Analysis of sequential changes in major histocompatibility complex expression in human liver grafts after transplantation. *Transplantation.* 1988;45(2):394–401.

28. *Burke, E. C., Martinez O. M., Freise C. E. et al.* MHC expression on human hepatocytes before and after isolation. *Transplant Proc.* 1991;23(1 Pt 2):1428–1429.
29. *So, S. K., Platt J. L., Ascher N. L., Snover D. C.* Increased expression of class I major histocompatibility complex antigens on hepatocytes in rejecting human liver allografts. *Transplantation.* 1987;43(1):79–85.
30. *Suehiro, T., Shimada M., Kishikawa K. et al.* Influence of HLA compatibility and lymphocyte cross-matching on acute cellular rejection following living donor adult liver transplantation. *Liver Int.* 2005;25(6):1182–1188.
31. *Kasahara, M., Kiuchi T., Uryuhara K. et al.* Role of HLA compatibility in pediatric living-related liver transplantation. *Transplantation.* 2002;74(8):1175–1180.
32. *Muro, M., Lopez-Alvarez M. R., Campillo J. A. et al.* Influence of human leukocyte antigen mismatching on rejection development and allograft survival in liver transplantation: is the relevance of HLA-A locus matching being underestimated? *Transpl Immunol.* 2012;26(2-3):88–93.
33. *Lan, X., Zhang M. M., Pu C. L. et al.* Impact of human leukocyte antigen mismatching on outcomes of liver transplantation: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2010;16(27):3457–3464.
34. *Smith, T. P., Presson T. L., Heneghan M. A., Ryan J. M.* Transjugular biopsy of the liver in pediatric and adult patients using an 18-gauge automated core biopsy needle: a retrospective review of 410 consecutive procedures. *AJR Am. J. Roentgenol.* 2003; 180(1):167–172.
35. *Miraglia, R., Maruzzelli L., Minervini M. I. et al.* Transjugular liver biopsy in liver transplant patients using an 18-gauge automated core biopsy needle. *Eur. J. Radiol.* 2011;80(3):e269–e272.
36. *Post, D. J., Douglas D. D., Mulligan D. C.* Immunosuppression in liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 1307–1314.
37. *Levitsky, J.* Next level of immunosuppression: drug/immune monitoring. *Liver Transpl*2011; 17 Suppl 3: S60–S65.
38. *Sood, S. et al.* Immune monitoring post liver transplant calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; 357: 2562–2575.
39. *Rovira, P., Mascarell L., Truffa-Bachi P.* The impact of immunosuppressive drugs on the analysis of T cell activation. *Curr Med Chem*2000; 7: 673–692.
40. *Wieland, E. et al.* Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients. *Ther Drug Monit.* 2010; 32: 560–572.
41. *Zahn, A. et al.* Immunomonitoring of nuclear factor of activated T cells-regulated gene expression: the first clinical trial in liver allograft recipients. *Liver Transpl* 2011; 17: 466–473.
42. *Sawitzki, B., Schlickeiser S., Reinke P., Volk H. D.* Monitoring tolerance and rejection in organ transplant recipients. *Biomarkers.* 2011; 16 Suppl 1: S42–S50.
43. *Israeli, M., Klein T., Brandhorst G., Oellerich M.* Confronting the challenge: individualized immune monitoring after organ transplantation using the cellular immune function assay. *Clin. Chim. Acta.* 2012; 413: 1374–1378.
44. *Levitsky, J.* Operational tolerance: past lessons and future prospects. *Liver Transpl* 2011; 17: 222-232
45. *Chung, S. W., Yoshida E. M., Cattral M. S., Hu Y., Goryczynski R. M.* Donor-specific stimulation of peripheral blood mononuclear cells from recipients of orthotopic liver transplants is associated, in the absence of rejection, with type-2 cytokine production. *Immunol Lett* 1998; 63: 91–96.
46. *Tanaka, Y., Tashiro H., Onoe T., Ide K., Ishiyama K., Ohdan H.* Optimization of immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living donor liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2012; 44: 555–559.
47. *Tanaka, Y., Ohdan H., Onoe T., Mitsuta H., Tashiro H., Itamoto T., Asahara T.* Low incidence of acute rejection after living donor liver transplantation: immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation*2005; 79: 1262–1267.
48. *Hricik, D. E. et al.* Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferongamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*2003; 3: 878–884.
49. *Näther, B. J. et al.* Modified ELISPOT technique--highly significant inverse correlation of post-Tx donor-reactive IFNgamma-producing cell frequencies with 6 and 12 months graft function in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* 2006; 16: 232–237.
50. *Reding, R., Gras J., Truong D. Q., Wie rs G., Latinne D.* The immunological monitoring of alloreactive responses in liver transplant recipients: a review. *Liver Transpl*2006; 12: 373–383.
51. *Mineo, D., Ricordi C.* Chimerism and liver transplant tolerance. *J Hepatol* 2008; 49: 478–480.