

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Protilátkami zprostředkované rejekce po transplantaci ledviny

Antibody-mediated rejection after kidney transplantation

MUDr. Janka Slatinská

2021

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA

Školící pracoviště: Klinika nefrologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Školitel: Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod	6
2. Hypotéza	6
3. Cíle práce	6
4. Materiál a metodika	6
5. Výsledky.....	7
5.1. Plazmaferézy a intravenózní imunoglobuliny u akutní protilátkami zprostředkované rejekce po transplantaci ledviny: zkušenosti jednoho centra.....	7
Úvod	7
Metodika	7
Léčba AMR.....	7
Výsledky.....	7
Závěr	8
5.2 Účinnost a bezpečnost léčby bortezomibem v léčbě refrakterní akutní protilátkami-zprostředkované rejekce – pilotní studie	9
Úvod	9
Metodika	9
Výsledky.....	9
Závěr	10
5.3 Solubilní CD30 a hepatocytární růstový faktor jako prediktivní marker protilátkami zprostředkované rejekce transplantované ledviny	10
Úvod	10
Metodika	11
Výsledky.....	11
Závěr	11
5.4 Solubilní BAFF cytokin a protilátkami zprostředkovaná rejekce po transplantaci ledviny	12
Úvod	12
Metodika	12
Výsledky.....	12
5.5 Transkriptom u akomodace a subklinické protilátkami zprostředkované rejekce po transplantaci ledviny	13
Úvod	13
Metodika	14
Výsledky.....	14
6. Diskuze.....	15
7. Závěry	19
8. Literatura	19
9. Seznam publikací	22

Abstrakt

Protilátkami zprostředkovaná rejekce (AMR) je v současnosti považována za hlavní příčinu dysfunkce a selhání funkce štěpu po transplantaci ledviny. Protilátky způsobují cévní poškození, které je buď akutní, nebo chronické, a může se manifestovat jako náhlá nebo progresivní dysfunkce štěpu. Rizikovými faktory pro vznik rejekce zprostředkované protilátkami jsou doba strávená na dialýze, opakovaná transplantace, předchozí sensitizace HLA antigeny, přítomnost panel-reaktivních protilátek. Diagnostika AMR je možná na základě průkazu depozice C4d složky komplementu v peritubulárních kapilárách (PTC) a přítomnosti dárcovsky specifických protilátek (DSA). Existuje také poškození způsobené protilátkami proti non-HLA antigenům, kdy nejsou DSA detekovatelné. Přínosem k upřesnění diagnostiky a stratifikace rizika je využití „molekulárního mikroskopu.“ Vysoká exprese ENDAT (endothelial activation and injury transcript) lépe predikuje riziko ztráty štěpu než stanovení C4d. Skórovací systém AMR na základě genové exprese koreluje s diagnózou AMR a predikuje ztrátu štěpu v budoucnosti.

Cílem práce bylo ověřit účinnost léčebných postupů a rozpoznat nemocné v riziku AMR.

V naší práci jsme prokázali efekt léčby akutní AMR pomocí kombinace plazmaferéz a IVIG.

U rezistentních forem akutní AMR s použitím inovativně protokolu zahrnujícím aplikaci bortezomibu, rituximabu a plazmaferéz jsme dosáhli zlepšení střednědobých výsledků přežívání transplantovaných ledvin.

Dále jsme prokázali, že nemocní s nízkými hodnotami HGF a vyššími hodnotami sCD30 před transplantací mají vysoké riziko rozvoje AMR. Solubilního BAFF (B cell activating factor) při současně probíhající protilátkové a buněčné rejekci, kde by mohl být BAFF pomocným markerem probíhající AMR.

Klíčová slova

Protilátkami zprostředkovaná rejekce (AMR), predikce, transkriptom, transplantovaná ledvina, markery, léčba

Abstract

Antibody-mediated rejection (AMR) is the main cause of the graft dysfunction and its failure after kidney transplantation. Antibodies lead to vascular damage that is either acute or chronic and manifests as sudden or progressive graft dysfunction. Risk factors for development of AMR are time spent on haemodialysis, retransplantation, previous sensitisation against HLA antigens, and persistence of panel-reactive antibodies. Diagnosis is based on detection of deposits of C4d component of complement in peritubular capillaries and presence of donor-specific antibodies (DSA). We can also observe injury caused by antibodies against non-HLA antigens without detection of anti-HLA DSA. Use of „molecular microscope“ can be beneficial in diagnosis and stratification of the risk of graft failure. High expression of ENDAT (endothelial activation and injury transcript) improves prediction of kidney graft failure more than C4d staining. Based on gene expression, the AMR scoring system correlates with the diagnosis of AMR and predicts graft loss in the future.

The main goal of our work was to recognize patients at risk of AMR. In our study, we confirmed the efficacy and safety of acute AMR therapy with plasmaphereses and administration of intravenous immunoglobulins for improving outcomes of kidney transplantation. In case of acute resistant AMR, we used a protocol with administration of bortezomib and rituximab, whereby we improved mid-term outcomes of kidney graft survival. In our study, we have shown that patients with low levels of HGF and higher levels of sCD30 before transplantation have high risk of developing AMR. We further evaluated the significance of soluble BAFF in concurrent antibody and cell-mediated rejection, where BAFF could be a beneficial marker of ongoing AMR.

Key words: antibody-mediated rejection (AMR), prediction, transcript, kidney transplantation, markers, treatment

1. Úvod

Transplantace ledviny je metoda volby léčby nezvratného selhání ledvin. Dlouhodobé výsledky jsou ovlivněny rejekcí, rekurencí základního onemocnění a úmrtím nemocných.

Rejekce transplantovaného orgánu může být způsobena imunitní odpovědí zprostředkovanou buňkami a/nebo protilátkami. Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce nastupuje krátce po transplantaci, nejčastěji kolem sedmého pooperačního dne, a má různé podoby.

Důležitým diagnostickým kritériem bylo zavedení detekce C4d, která vzniká v průběhu aktivace komplementu klasickou cestou, ve tkáni štěpu ledviny. Během aktivace C4 dojde ke štěpení této složky a postupně se vytvoří terminální produkt (C4d), který se rychle váže na cílové struktury. H. Feucht v r. 1991¹ jako první popsal průkaz štěpného produktu komplementu C4d v peritubulárních kapilárách po navázání protilátek příjemce na endotel peritubulárních kapilár štěpu. A v roce 1993 byla postulována asociace mezi C4d a ztrátou funkce transplantovaného štěpu (Feucht HE. Et al., 1991, 1993)^{1 2}. V roce 1999 Collins AB. a kol.³ prokázali korelaci mezi C4d depozicí v peritubulárních kapilárách a přítomnosti cirkulujících DSA protilátek u příjemců transplantovaných orgánů (Collins AB. et al., 1999)³. Depozita C4d mohou být prokazována imunofluorescenční technikou nebo imunoperoxidázovou technikou z tkání zpracovaných v parafínu. V současnosti detekce C4d představuje standard histopatologického vyšetření u transplantovaných ledvin (Colvin RB. et al., 2007)⁴.

Druhým klíčovým momentem v detekci protilátek bylo zavedení jejich přímé detekce. Do té doby jsme prováděli cytotoxický test, který vázal komplement (klasický crossmatch) a rozlišení HLA protilátek I. a II. třídy umožňovaly metody průtoková cytometrie. Detekce dárcovsky specifických protilátek (donor-specific antibody, DSA), tedy anti-HLA protilátek příjemce proti konkrétním antigenům dárce, byla zpřesněna použitím technologie Luminex, která detekuje protilátky na základě synteticky vyrobených antigenů a umožňuje jejich kvantifikaci.

V Banffské klasifikaci (Solez K. et al., 2007)⁴ je termín „akutní protilátkami zprostředkované rejekce“ poprvé uveden v roce 2003 a v roce 2005 byla představena nosologická jednotka „chronická aktivní protilátkami zprostředkovaná rejekce“ na základě znalostí humorálních mechanismů poškození transplantovaných orgánů.

2. Hypotéza

Protilátkami zprostředkovaná rejekce je nejvýznamnějším faktorem limitujícím dlouhodobé přežití transplantované ledviny. Na její patogenezi se podílejí již přítomné nebo de novo anti-HLA protilátky, zaměřené proti antigenům dárce. V procesu rejekce jsou zapojeny efektorové a regulační imunitní mechanismy. Využitím depleční terapie lze dosáhnout zvýšení podílu regulačních B i T lymfocytů. V diagnostice druhu a závažnosti rejekce se nověji uplatňuje vyšetření genové exprese umožňující přesnější stanovení prognózy štěpu.

3. Cíle práce

Cíle práce jsou zaměřeny na zkoumání patofyziologie diagnostických a terapeutických aspektů AMR.

1. Ověřit efektivitu léčebných postupů protilátkami zprostředkované rejekce.
2. Ověřit roli transkriptomu v transplantované ledvině.
3. Ověřit roli B-buněčných fenotypů v periferní krvi ve vztahu k rejekci.
4. Ověřit roli markerů: solubilní CD30 molekuly a HGF (Hepatocyte Growth Faktor) v predikci protilátkami zprostředkované rejekce.

4. Materiál a metodika

Použité metody a soubory pacientů jsou podrobně popsány v příložených publikacích.

Populace

K analýzám jsme použili renální tkáň a periferní krev pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny v Transplantačním centru IKEM Praha.

Biopsie štěpu ledviny

Protokolární biopsie byla provedena ve 3. měsíci po transplantaci ledviny, indikační biopsie při vzestupu kreatininu o víc než 10 %, progresi proteinurie či přetrvávající afunkci štěpu ledviny. Histologické vyšetření bylo

provedeno v souladu s Banffskou klasifikací 2005 a jejími aktualizacemi, poslední z roku 2018. Malá část (2 mm) z kortikální oblasti bioptického vzorku byla okamžitě uskladněna ve stabilizačním roztoku (RNA later) a skladována při teplotě -80°C do extrakce RNA.

RNA extrakce a komplementární syntéza DNA

Po homogenizaci renální tkáně jsme izolaci RNA provedli s použitím RNA blue agent. Izolovanou RNA jsme zředili v 30 μL vody očištěné od RNázy. Čistotu a koncentraci jsme ověřili spektrofotometricky (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). K další analýze jsme použili jen vysoce kvalitní RNA s číslem RNA integrity 8–10. Dva μg RNA jsme použili k přepisu do komplementární DNA s použitím Superscript reversní transkriptázy (Nitrogen, CA, USA). RNA byla ošetřena DNázou. Jen komplementární vzorky DNA bez kontaminace genomickou DNA byly použity k analýze metodou real-time RT-PCR pomocí TaqMan low-density array (TLDA).

Real-Time RT-PCR analýza s použitím TaqMan low-density array (TLDA)

Vyšetření genového expresního profilu bylo provedeno použitím kvantitativní eseje real-time RT-PCR založené na technologii Taqman low-density array (TLDA).

Analýza dat genových expresí

Hodnoty relativní genové exprese jsme získali z TLDA analýzy použitím $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ metody pro relativní kvantifikaci (RQ, z angl. relative quantity), která je implementována v Applied Biosystems RQ Manager Software v1.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). K výpočtu relativní kvantity jsme porovnali genovou expresi zkoumaného vzorku s kontrolním vzorkem.

Ke statistické analýze dat jsme použili statistický program SPSS verze 16 (Chicago, IL, USA). Použité statistické metody jsou podrobně popsány v jednotlivých publikacích.

5. Výsledky

5.1. Plazmaferézy a intravenózní imunoglobuliny u akutní protilátkami zprostředkované rejekce po transplantaci ledviny: zkušenosti jednoho centra

Úvod

Časná AMR představuje 5–10 % všech akutních rejekcí (Feucht HE, 2003)⁵. Riziko ztráty funkce transplantované ledviny je vysoké, jednorocní přežívání štěpu je nízké (15–50 %) i přes intenzivní imunosupresivní léčbu (Halloran PF., Madres J., 1990; Sellares J., et al., 1992)^{6 7}.

Metodika

V TC IKEM od 1. 1. 2002 do 31. 12. 2006 bylo provedeno celkem 936 transplantací ledvin. Diagnóza AMR byla potvrzena u 26 nemocných (2,8 %). Cílem naší studie byla analýza 24 pacientů s dg akutní AMR, kteří byli léčeni buď samotnou plazmaferézou (PF) nebo v kombinaci s IVIG. Dva nemocní byli ze studie vyloučeni z důvodu aplikace rituximabu.

Třináct nemocných bylo léčeno pouze PF, 11 pacientů bylo léčeno kombinací PF a IVIG. Udržovací imunosupresivní léčba se skládala z kombinace kalcineurinových inhibitorů, kterým byl takrolimus (0,2 mg/kg) nebo cyklosporin A (8 mg/kg) s mykofenolát mofetilem a kortikoidy.

U pacientů s PRA více než 50 % byla podána indukční léčba OKT3 (antiCD3 monoklonální protilátka muromonab,) anebo ATG (od roku 2005 muromonab není k dispozici v ČR). Při obou indukcích byla účinnost imunosuprese monitorována průtokovou cytometrií, pokud bylo přítomno méně než 50 CD3+ buněk v periferní krvi, byla indukce ukončena. Současně probíhající akutní T-buňkami zprostředkovaná rejekce byla léčena metylprednisolonem nebo ATG.

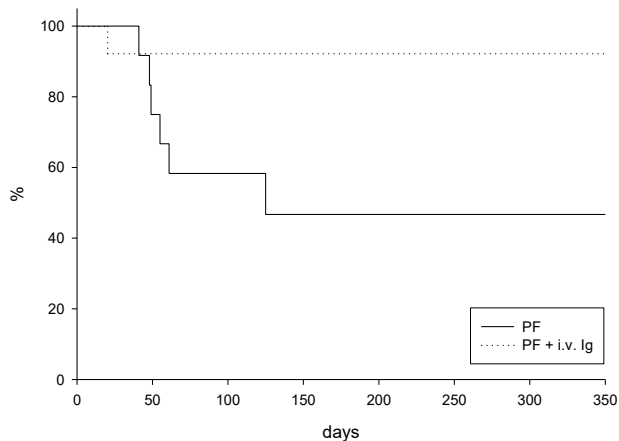
Léčba AMR

Cílem studie bylo zhodnocení účinnosti terapie ve dvou obdobích s použitím různých postupů. V letech 2002–2003 byli nemocní léčeni 5 cykly PF, v letech 2004–2006 byli léčeni kombinací 5 cyklů PF s aplikací 5 dávek IVIG v dávce 0,5 g/kg.

Výsledky

AMR jsme pozorovali u 26 nemocných z 936 provedených transplantací ledvin v letech 2002–2006. V letech 2002–2003 jsme léčili akutní AMR pomocí PF 13 pacientů z 350 nemocných, kteří podstoupili transplantaci ledviny. V letech 2004–2006 bylo provedených 586 transplantací, u 11 nemocných byla dignostikována akutní AMR, kterou jsme léčili kombinací PF a IVIG, 2 pacienti dostali k této kombinaci ještě rituximab. Nemocní ze skupiny PF/IVIG měli lepší výsledky přežívání štěpu rok po transplantaci v porovnání s historickou skupinou ($p = 0,044$ (Obrázek 8).

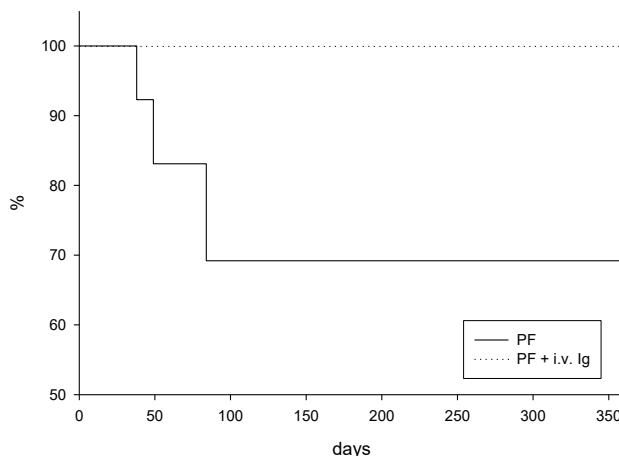
vs. PF + IVIG)



+

Deset nemocných ze skupiny PF/IVIG mělo funkční štěp 1 rok po transplantaci a pouze 4 štěpy v skupině s PF byli funkční do 1 roku po transplantaci. Šest transplantovaných ledvin ze skupiny PF bylo selhaných v prvním roce a 3 nemocní zemřeli. Pacienti léčení PF/IVIG měli trend k lepšímu přežívání pacientů ($p = 0,056$, Obrázek 9).

PF vs. PF + IVIG)



Dva nemocní zemřeli na bronchopneumonii a 1 nemocný zemřel doma s funkčním štěpem na kardiovaskulární komplikaci. V obou skupinách jsme pozorovali stejný výskyt infekčních komplikací.

Co se týče pozitivita C4d složky komplementu, tak obě skupiny měly v rebiopsiích podobný výskyt. Avšak nutno připomenout, že rebiopsie ve skupině PF/IVIG byly realizovány později vzhledem k lepšímu klinickému efektu.

Závěr

Léčba kombinací PF a IVIG představuje bezpečnou a účinnou terapii akutní AMR. V současné době kombinace plazmaferéz a aplikace intravenózních imunoglobulinů v léčbě akutní AMR představuje standard léčby, což bylo potvrzeno i v KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) guidelines z roku 2010 pracovní skupinou odborníků v transplantaci medicíně (Kasiske BL. Et al., 2010) ⁸.

Článek byl publikován v časopise *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. IF: 1,623

Plasmapheresis and Intravenous Immunoglobulin in Early Antibody-Mediated Rejection of the Renal Allograft: A Single-Center Experience. *Ther Apher Dialy*. 2009 Apr;13(2):108-112.

5.2 Účinnost a bezpečnost léčby bortezomibem v léčbě refrakterní akutní protilátkami-zprostředkované rejekce – pilotní studie

Úvod

Cílem naší studie bylo analyzovat účinnost a bezpečnost podání bortezomibu a rituximabu v léčbě refrakterní (rezistentní) AMR. Rezistentní AMR je definována perzistující zhoršenou funkcí renálního štěpu i přes léčbu PF s aplikací IVIG a intravenózního podání kortikosteroidů. Imunosupresivní protokol léčby rezistentní AMR zahrnuje podání bortezomibu (1 cyklus představuje 4x podání bortezomibu v dávce 1,3 mg/kg) před každou PF, 1 dávky rituximabu (375 mg/m²) a intravenózní podání malé dávky kortikosteroidů, jak bylo publikováno Walshem CR. et al., 2012)⁹. V období od 1/2012 do 6/2015 bylo v našem TC provedeno 772 transplantací ledviny a akutní refrakterní AMR jsme diagnostikovali u 23 pacientů (3 %).

Metodika

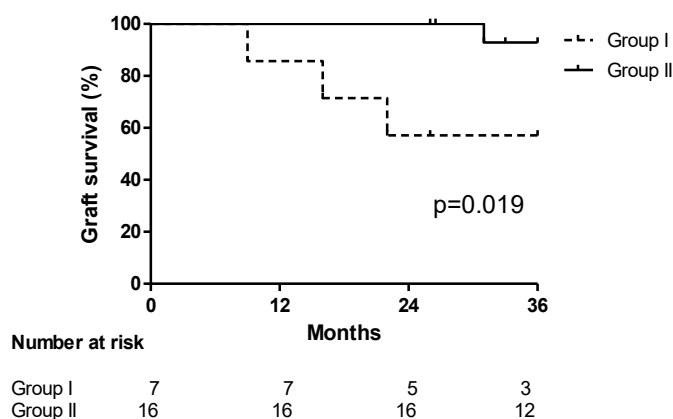
Všichni nemocní měli negativní komplement-dependentní crossmatch (CDC) před transplantací. V době diagnózy rezistentní akutní AMR mělo 52 % pozitivní CDC test. Průtokovou cytometrii jsme potvrdili pozitivitu na T-buňkách u 56,5 % a na B-buňkách u 91,3 % nemocných. DSA detekce byla provedena metodikou single bead assay protilátkam proti HLA-A, B, DR a DQ antigenů. Všechna séra byla ošetřena metodou EDTA kvůli eliminaci prozone efektu. Byly stanovené hodnoty positivity: HLA I. třídy 1000 MFI a II. třídy 2000 MFI.

Podle renální funkce byli nemocní rozděleni do 2 skupin: první skupinu tvořili nemocní, u kterých jsme po 6 měsících léčbě bortezomibem v době zaznamenali vzestup sérového kreatininu o víc než 25 % oproti hodnotě v době diagnózy akutní rezistentní AMR, druhou skupiny tvořili nemocní se stabilní renální funkcí. Skupinu 1 tvořilo 7 pacientů, u kterých bylo v porovnání se skupinou 2 (16 nemocných) významně horší 3leté přežívání štěpu ($p=0,019$ Obr. 1).

Výsledky

V rizikové kohortě progresorů byla většina pacientů mužského pohlaví, statistickou analýzou jsme nepotvrdili rozdíly v HLA neshodách, HLA mismatchích, době dialýzy či době nástupu rozvoje funkce transplantované ledviny.

Obr. 1: Přežívání štěpů: progresoři vs non-progresoři



Diagnóza byla založena dle Banffské klasifikace z roku 2011 (Mengel M., 2012)¹⁰. Časná akutní AMR byla diagnostikována nejdéle 3 měsíce po transplantaci ledviny. Pacienti s diagnózou refrakterní AMR byli nejprve léčeni konvenční léčbou AMR: 5 cyklů PF + 5 dávek IVIG (0,5 g/kg). V případě selhání konvenční léčby byl použit protokol s bortezomibem a rituximibem. Z nežádoucích účinků léčby nejčastěji dominovaly hematologické komplikace: trombocytopenie (78,3 %), leukopenie (56,5 %), dále to byly častější močové infekce (34,8 %) a septické stavy (30,4 %). Závažnou komplikací byla polyneuropatie dolních končetin, která byla prokázána u 6

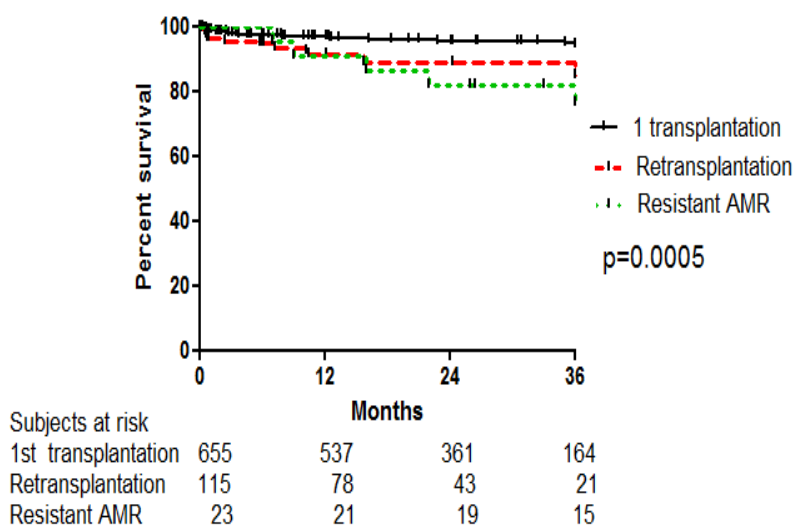
pacientů, pouze u 2 nemocných došlo k vyléčení nemoci. Léčebný protokol s bortezomibem byl pacienty dobře tolerován, bez průkazu závažných oportunních infekcí či maligních onemocnění.

Po léčbě bortezomibem jsme pozorovali signifikantní pokles DSA ve HLA třídě B ($p = 0,004$) a HLA třídě DR ($p = 0,0005$), léčba neovlivnila HLA třídu A ($p = 0,106$) a HLA ve třídě DQ ($p = 0,18$) (Wilcoxon-matched pairs-signed rank test).

Všechna séra byla předpřipravená s EDTA k vyloučení pro-zone efektu (rozlišení poklesu DSA v I. třídě, DR a DQ). Analogické výsledky s deplecí (de novo) DSA byly publikovány Touzot a kol., kteří pozoroval snížení DSA-DR, ale nedošlo k poklesu DS-DQ protilátek (Touzot M. et al., 2015)¹¹.

Přežívání štěpů ledvin s diagnózou akutní rezistentní AMR (skupina I vs. skupina II) je zobrazeno ve obr. 10. Nemocní s dobrou klinickou odpovědí (skupina II) měli signifikantně lepší přežívání štěpu ($p = 0,019$). Pacienti s přetrvávající zhoršenou funkcí (elevace sérového kreatininu) (skupina I) měli závažnou nefrotickou proteinurii. Křivka přežívání štěpů po léčbě akutní rezistentní AMR vs. přežívání nemocných, kteří podstoupili retransplantaci je srovnatelná ($p = 0,159$). Statisticky byl potvrzen rozdíl ve 3letém přežívání transplantovaných štěpů po první transplantaci a přežívání štěpů po léčbě rezistentní AMR ($p = 0,006$), taktéž jsme potvrdili významný rozdíl ve 3letém přežívání štěpů po 1. transplantaci a retransplantacích ($p = 0,0132$) (Obr. 2).

Obr. 2: Tříleté přežívání štěpů: 1. transplantace, retransplantace a pacienti léčení pro rezistentní AMR



Závěr

Terapeutický protokol založený na podávání bortezomibu při léčbě rezistentní AMR byl bezpečný a dobře tolerován. Nepozorovali jsme život ohrožující komplikace jako oportunní infekce nebo maligní onemocnění. Střední doba přežívání štěpů nemocných s akutní rezistentní AMR byla srovnatelná s přežíváním štěpů po opakovaných transplantacích.

Podávání bortezomibu v kombinaci s rituximabem a plazmaferézami bylo účinné ke snížení hodnot DSA-B a DSA-DR, ale nebylo dostatečně účinné ke snížení dárcovsky-specifických protilátek DSA-A a DSA-DQ.

Vzhledem k možné toxicitě bortezomibu je použití v léčbě značně limitováno.

Článek byl publikován v časopise HLA. IF: 1,0

Efficacy and safety of BORTEZOMIB treatment for refractory acute antibody-mediated rejection – a pilot study. HLA 2018 Dec;92 Suppl (2):47-50.

5.3 Solubilní CD30 a hepatocytární růstový faktor jako prediktivní marker protilátkami zprostředkované rejekce transplantované ledviny

Úvod

Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce (AMR) i přes úspěšnou léčbu často vede k rozvoji chronické nefropatie štěpu. Monitorace pre- a posttransplantačních sérových koncentrací solubilní CD30 (sCD30) molekuly, slouží k predikci rizika vzniku rejekce štěpu a následně k jeho selhání.

CD30 molekula je aktivační marker exprimovaný na CD8+ a CD4+ lymfocytech, který stimuluje B buňky a inhibuje Th1 imunitní odpověď. Jeho solubilní forma je proteolyticky uvolněna z povrchu lymfocytu aktivací zinkové metalloproteinázy. Vazbou CD30 molekuly pomocí ligandu na B-lymfocyty dochází k proliferaci a sekreci imunoglobulinu

Novým příslibem se jeví hepatocytární růstový faktor (Hepatocyte growth factor – (HGF)). HGF je multifunkční cytokin, jehož koncentrace vzrůstá při rejekci u orgánových transplantací. Jedinou prací, která se zabývá predikcí rozvoje akutní rejekce pomocí sledování sCD30 a koncentrace HGF je práce Mahmouda K. et al., 2007¹² u příjemců transplantovaných ledvin.

Cílem naší retrospektivní práce bylo klinické zhodnocení naměřených hodnot sCD30 a HGF k predikci tvorby DSA a zároveň posoudit riziko rozvoje AMR u příjemců po transplantaci ledviny. Hodnocení sCD30, HGF koncentrací a anti-HLA protilátek bylo před transplantací a v pravidelných intervalech po transplantaci.

Metodika

V naší studii bylo analyzováno 205 pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny v období od ledna 2006 do prosince 2007. Krevní sérum bylo odebráno krátce před transplantací, 2 týdny a 6 měsíců po transplantaci ledviny. Medián sledování pacientů po transplantaci byl 730 ± 20 dní. U všech nemocných jsme vyšetřili sCD30 před transplantací pomocí ELISA testu. Hraniční hodnota pro pozitivitu byla 100 U/ml na základě dostupných údajů z literatury. HGF koncentrace byla měřena pomocí Fluorokin xMAP cytokininového multiplexového testu.

Výsledky

V našem souboru byla vyšší incidence preformovaných protilátek HLA v I. třídě u nemocných, kteří ztratili ledvinu z imunologických příčin v porovnání s funkčními štěpy ledvin (45 % vs. 28 %, $p = 0,082$). Ve dvouletém období 5 % nemocných selhalo z důvodu závažné rejekce a u 6,8 % nemocných došlo k úmrtí nebo ztrátě transplantovaných ledvin z jiných příčin než akutní rejekce. Vyšší incidence vzniku akutní AMR byla pozorována u nemocných po opakovaných transplantacích. Hodnota solubilního CD30 před a po transplantaci ledviny nekoreluje s přežíváním štěpu do konce sledovaného období. Pozorovali jsme tendenci k vyšší incidenci AMR u nemocných před retransplantací s elevací sCD30 (≥ 100 U/ml) ($p = 0,051$). Nebyla prokázána korelace mezi sCD30 a výskytem AMR u prvních transplantací, avšak v případě pozitivních hodnot sCD30 a při přítomnosti antiHLA protilátek je přítomna vyšší incidenci AMR ($p < 0,001$).

Samotná HGF koncentrace není asociována s incidencí AMR, také nebyla nalezena korelace mezi HGF a přežíváním štěpů. U nemocných, u kterých krátce po transplantaci dochází k poklesu sCD30, hodnota HGF vzrůstá, 480 ± 249 pg/ml před a 1108 ± 714 pg/ml 2 týdny po transplantaci. Nižší předtransplantační hodnoty HGF korelují s přítomností HLA protilátek ve II. třídě před a 6 měsíců po transplantaci, ale ne s hodnotami HLA protilátek I. třídy ($p < 0,001$ vs. $p = 0,05$).

Nemocní s nízkými hodnotami HGF a vyššími hodnotami sCD30 před transplantací mají vysoké riziko rozvoje AMR.

Simultánní přítomnost anti-HLA protilátek I. a II. třídy (CLI +/- CLII +/-) před transplantací, je signifikantní faktor rozvoje AMR. Validace byla provedena na celé kohortě (OR 12,87; CI 4,24–39,26) a nemocných po první transplantaci ($p < 0,0001$). Nemocní po retransplantacích měli nejkratší dobu do rozvoje AMR u skupiny CLI +/- CLII +/-, i když nebyla dosažena statistická významnost (62,5 %; $n = 16$).

Závěr

Naše studie ukazuje, že hodnota sCD30 spolu se současnou přítomností anti-HLA protilátek před transplantací signifikantně predikuje rozvoj AMR. V budoucnosti ve studiích by mohla být zodpověděna otázka významu HGF, jednak jako markeru akutní rejekce nebo jeho vysoké koncentrace před transplantací jako protektivního faktoru vzniku rejekce.

Článek byl publikován v časopise *Transplant Immunology*. IF: 1,697

Soluble CD30 and Hepatocyte growth factor as predictive markers of antibody-mediated rejection of the kidney allograft. *Transplant Immunology*. 2011 Jul;25(1):72-76.

5.4 Solubilní BAFF cytokin a protilátkami zprostředkovaná rejekce po transplantaci ledviny

Úvod

Protilátkami-zprostředkovaná rejekce představuje závažnou imunologickou komplikací, která může vyústit v selhání štěpu transplantované ledviny.

Je známý podíl cytokinů při tvorbě a vyžívání B lymfocytů. B-buňkami aktivující faktor (BAFF) je cytokin, kteří patří do rodiny TNF a podporuje přežívání, vyžívání a aktivaci B lymfocytů. BAFF existuje ve 2 formách: jako transmembránový protein a jako solubilní trimer. Expres BAFF je zesílena pomocí IFN- α , IFN- γ a IL-10. Excesivní tvorba BAFF může spouštět autoimunní onemocnění, jako např. systémový lupus erythematosus, revmatoidní artritidu a jiné. BAFF přispívá k produkci DSA a koreluje s poruchou funkce štěpu transplantované ledviny.

Cílem naší studie bylo porovnat BAFF hodnoty mezi pacienty ve vysokém imunologickém riziku s diagnostikovanou AMR a kontrolní skupinou bez rejekce, a zjistit, zda stanovení koncentrací BAFF koncentrací může být diagnostickým markerem k predikci AMR.

Metodika

Do studie bylo zahrnuto 36 nemocných, 19 pacientů s AMR v období 2009–2013. AMR byla diagnostikována do 2. měsíce po transplantaci ledviny, pacienti byli sledováni do 1 roku po transplantaci. Pacienti z kontrolní skupiny byli transplantováni v letech 2004–2005, po transplantaci měli okamžitý rozvoj funkce štěpu a neměli žádnou rejekci v období 10 let po transplantaci. Materiál byl získán 0–21 dnů před transplantací. U nemocných bez průkazu rejekce jsme stanovili BAFF 3 měsíce po transplantaci, zatímco nemocní s AMR měli stanovení BAFF v rozpětí od 0–2 měsíce po transplantaci. V naší studii byl analyzován pouze solubilní BAFF.

Hodnoty BAFF byly měřeny pomocí Xmap (Luminex), minimální koncentrace byla stanovena na hodnotách 0,56 pg/ml. Hranice pro stanovení anti-HLA protilátek byly 1000 MFI pro I. třídu a 2000 MFI pro II. třídu.

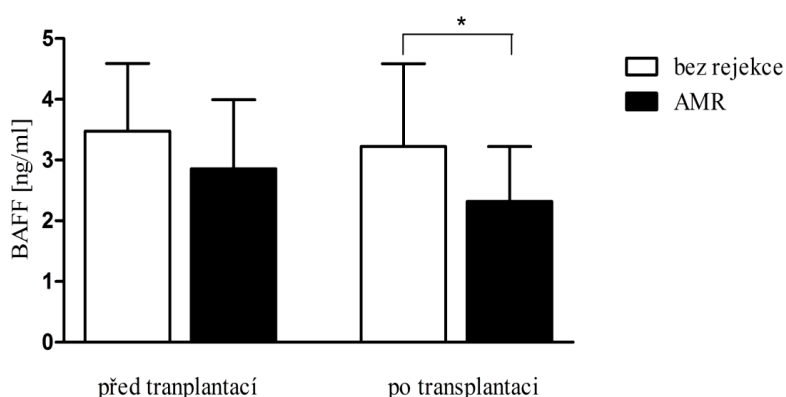
Výsledky

Nemocní s AMR měli signifikantně vyšší hodnoty sérového kreatininu po transplantaci v 1., 3., 6. a 12. měsíci.

Rizikové faktory pro vznik AMR

Hodnoty BAFF v séru byly vyšší u nemocných bez výskytu AMR před transplantací než u nemocných, kteří vyvinuli AMR, avšak bez statistické signifikance. Po transplantaci byly potvrzeny statisticky vyšší hodnoty BAFF u příjemců bez rejekce (Obrázek 1).

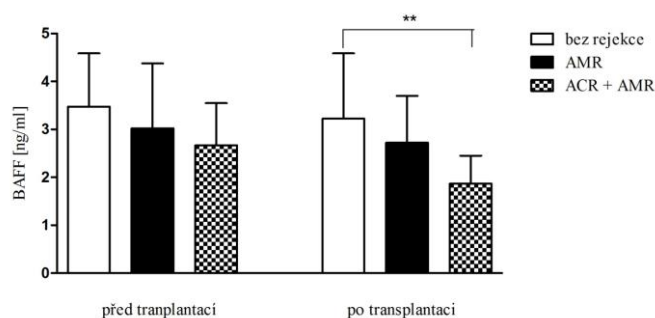
Obrázek 1: Koncentrace BAFF před a po transplantaci, $p < 0.05$



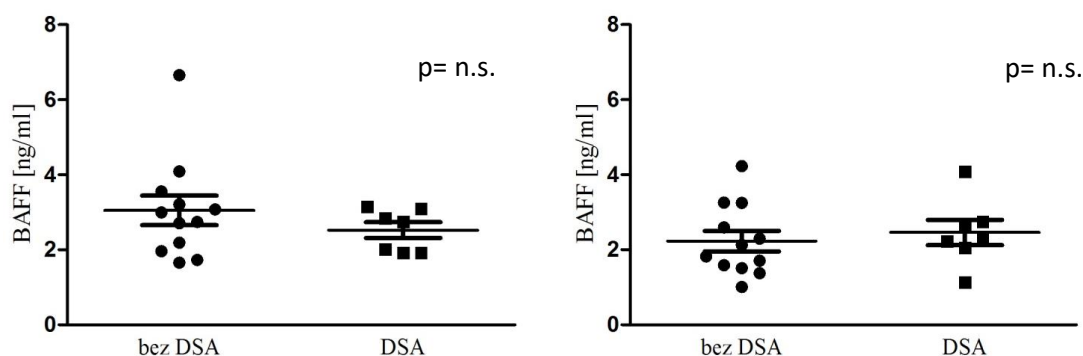
Rizikové faktory pro vznik kombinované AMR a ACR rejekce

Hodnoty BAFF před transplantací byly nižší u příjemců s rejekcí, avšak bez statistické signifikance. Naproti tomu hodnoty BAFF po transplantaci byly statisticky nižší u nemocných s kombinovanou AMR a ACR (Obrázek 2). Při analýze nemocných s AMR a hodnotou BAFF před a po transplantaci nebyla nalezena korelace vzhledem k tvorbě DSA (Obrázek 3).

Obrázek 2: BAFF před a po transplantaci u nemocných bez rejekce, s AMR a ACR+ AMR, $p < 0$.



Obrázek 3: Koncentrace BAFF před a po transplantaci s korelací DSA



Závěr

Srovnáním koncentrace cytokinu BAFF před a po transplantaci ledviny jsme nezjistili statisticky významný rozdíl mezi pacienty, kteří vyvinuli akutní rejekci oproti nemocným, kteří akutní rejekci neměli. Hodnoty BAFF v době AMR byly signifikantně nižší u nemocných, kteří měli současně kombinovanou AMR a ACR, než u pacientů bez rejekce. Nemocní, kteří měli pouze akutní AMR, měli trend k nižším koncentracím BAFF. Nepozorovali jsme korelaci mezi hodnotami BAFF a produkcí DSA při AMR. Naše měření podporují myšlenku, že solubilní BAFF může být pomocným markerem probíhající AMR, zejména při současně přítomné protilátkami zprostředkované rejekci v kombinaci s akutní celulární rejekci po transplantaci ledviny.

Článek byl publikován v časopise *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. IF: 2,040

Soluble BAFF Cytokine Levels And Antibody-Mediated Rejection of the Kidney Allograft. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2016 Dec;64(1):47-53.

5.5 Transkriptom u akomodace a subklinické protilátkami zprostředkované rejekce po transplantaci ledviny

Úvod

Transplantace ledviny od ABO inkompatibilních dárců představuje možnost navýšení počtu transplantací. Desensitizační protokoly u ABOi transplantací vedou ke snížení titru hemaglutininů, nicméně přítomnost nízkého titru hemaglutininu ukazuje na interakci mezi protilátkou a endotelem. Ta se pak projeví při histologickém vyšetření biopsie štěpu jako depozice C4d složky komplementu v PTC. V IKEM až 76 % kontrolních biopsií ve 3. měsíci po transplantaci vykazovalo pozitivní C4d nález při současně stabilní funkci ledvinného štěpu (Osickova K. et al., 2018, Hrubá P. et al., 2019)^{13,14}. Tento stav je označován jako akomodace. Vlastní mechanismus akomodace nebyl dosud dostatečně objasněn. Výsledky vycházející z *in vitro* studií na kulturách endoteliálních buněk (Iwasaki O., Noma K., 2012)¹⁵ ukazují na možnou úlohu regulačních proteinů komplementu a protiapoptických proteinů. Podobná situace je u pacientů, kteří podstupují HLA inkompatibilní transplantaci, tj. transplantace provedená od dárců ledvin, proti kterým příjemce vytváří DSA. Také u těchto pacientů C4d depozice v PTC potvrzuje interakci mezi DSA a endotelem a je považována za diagnostický marker AMR. Nicméně u HLAi pacientů s nízkými hladinami DSA a C4d pozitivním nálezem v protokolárních biopsiích může být funkce štěpu stabilní. Na rozdíl od ABOi inkompatibilních transplantací ledvin, výsledky HLAi inkompatibilních transplantací s preformovanými DSA

mají horší přežívání než HLA kompatibilní transplantace. Hypotéza naší práce byla, že mechanismy, které vznikají následně po vazbě protilátky na cévní endotel u ABOi a HLAi transplantací, jsou rozlišné.

Metodika

Soubor pacientů

Provedli jsme retrospektivní, observační studii, které se účastnila dvě transplantační centra, IKEM a Hannover. Cílem studie bylo zjistit, jaký je rozdíl mezi biopsiemi, kde je C4d depozice vyvolána přítomností hemaglutininů, a biopsiemi, kde je depozice C4d vyvolána přítomností DSA. Pomocí microarray čipové analýzy jsme porovnali transkripční profil tříměsíčních protokolárních biopsií u tří skupin pacientů: 1. C4d-pozitivní biopsie pacientů po ABOi transplantaci se stabilní funkcí štěpu (n = 11) 2. C4d-pozitivní biopsie pacientů po HLAi transplantaci s DSA s diagnózou subklické AMR (n=7) a 3. C4d-negativní biopsie pacientů po HLA kompatibilní transplantaci s normálním nálezem a stabilní funkcí štěpu (n = 8).

Pacienti v kontrolní skupině neměli detekovány DSA a měli nízké PRA. Kromě positivity C4d měli všechny 3 skupiny přibližně stejné Banff skóre.

K validaci rozdílů mezi skupinami, zjištěných pomocí microarray analýzy, jsme použili soubor 27 nemocných, kteří byli transplantováni v období mezi roky 2005 a 2016 v IKEM a Hannover Medical School. Pro tuto validaci byla zvolena technika RT-qPCR. Klinické charakteristiky byly stejné jako u pacientů analyzovaných pomocí microarray.

Výsledky

sAMR u HLAi a akomodace u ABOi transplantaci sdílí podobnou dráhu/cestu imunoaktivace jako C4 negativní kontroly

U ABOi skupiny byla zvýšená exprese transkriptů asociovaných s GO termínem mitochondrion ($p = 0,016$) a u HLAi skupiny s GO termíny oxidation and reduction ($p = 6,90 \times 10^{-5}$), carboxylic and organic acid catabolic processes ($p = 3,70 \times 10^{-4}$) a několik GO termínů souvisejících se skupinou solute carrier family genes (ion transport, cation transport, anion transport).

Transkripty zvýšené u kontrolní skupiny byly zastoupeny méně, v 31 % (v porovnání s ABOi skupinou) a 40 % (v porovnání s HLAi skupinou) ze všech deregulovaných genů. Tyto transkripty se zvýšenou expresí u C4d negativních nálezů v porovnání s ABOi skupinou byly asociovány s GO termíny defense response ($p = 2,7 \times 10^{-6}$), response to wounding ($p = 5,3 \times 10^{-5}$), inflammatory response ($p = 1,00 \times 10^{-4}$) a complement activation ($p = 6 \times 10^{-3}$).

Expese proteinů regulujících komplement CD46 a CD59 je asociována s C4d pozitivitou

Zvýšená exprese CD59 transkriptu, spolu se sníženou expresí C5 transkriptu pouze u ABOi skupiny naznačuje možnou regulační úlohu této molekuly v akomodaci. U obou inkompatibilních skupin pacientů (ABOi i HLAi) byla zvýšená exprese *CD46* (*MCP*). CD46 je kofaktor, který se účastní degradace složek komplementu C3b a C4b. Při porovnání pouze ABOi a HLAi skupiny s C4d negativní kontrolou byla zvýšená aktivace komplementové dráhy pozorována pouze u HLAi kohorty.

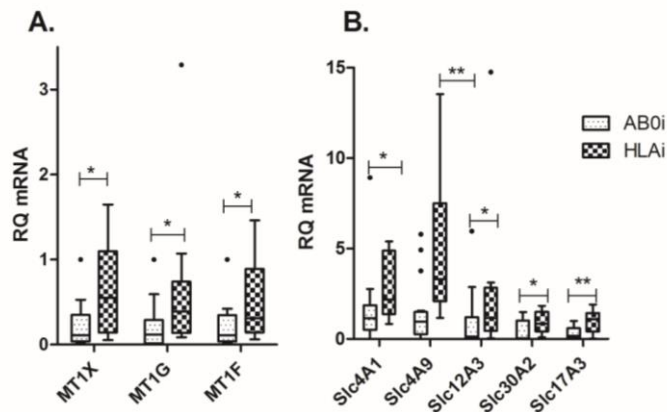
Zvýšená exprese metalotioneinů a transkriptů z rodiny solute carrier family u HLAi v porovnání s ABOi štěpy

Pomocí microarray jsme porovnali transkripční profil mezi C4d pozitivními biopsiemi ABOi a HLAi pacientů. Genová anotační analýza genů, jejichž exprese byla snížena u ABOi skupiny odhalila asociace s GO termíny cadmium ion binding a několik GO termínů s vysokou expresí transkriptů z rodiny solute carrier family (basolateral plasma membrane, plasma membrane a anion transmembrane transporter activity). Šest transkriptů spadajících do GO termínu cadmium ion binding patří mezi metalotioneiny první třídy (*MT1F*, *MT1G*, *MT1H*, *MT1E*, *MT1M* and *MT1X*).

Validací byla potvrzena snížena regulace metallothioninů a transkriptů genů z rodiny solubilních transportérů u ABOi kohorty

Validací pomocí RT-qPCR jsme potvrdili nižší expresi transkriptů z rodiny solute carrier family (*SLC4A1*: anion exchanger, $p = 0,018$; *SLC4A9*: sodium bicarbonate cotransporter, $p = 0,003$; *SLC17A3*: organic anion transporter, $p = 0,045$; *SLC12A3*: sodium/chloride transporter, $p = 0,035$; *SLC30A2*: zinc transporter, $p = 0,037$) a nižší expresi metalotioneinů *MT1F* ($p = 0,045$), *MT1G* ($p = 0,031$) a *MT1X* ($p = 0,021$) u ABOi pacientů v porovnání s HLAi pacienty (Obr. 1).

Obrázek 1: Expres transkriptomů u ABOi a HLAi transplantací



Článek byl publikován v časopise *Transplantation*. IF: 4,26

Molecular Patterns Discriminate Accommodation and Subclinical Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2019 May;103(5):909-917.

6. Diskuze

Transplantace ledvin od HLA inkompatibilních příjemců stimuluje aloimunní odpověď, která je klinicky vyjádřena jako rejekce štěpu. Se zavedením cyklosporinu do klinické praxe v 80. letech došlo k výraznému snížení incidence akutní rejekce. Dalším důležitým momentem ve vývoji bylo zavedení T-buněčné deplece jako indukční léčby v 90. letech. Výrazné snížení incidence akutní rejekce významně zlepšilo krátkodobé i dlouhodobé výsledky přežívání transplantovaných ledvin.

Akutní rejekci dělíme podle mechanismu účinku na T-buňkami a B-buňkami zprostředkovanou (protilátkovou) rejekci. Mezi rizikové faktory rejekce patří sensitizace HLA systému (PRA), opakované transplantace, afroamerické etnikum. Wehmeier C. a kol (2017)¹⁶ uvádějí jako riziko, předtransplantační DSA a HLA AB/DR neshody jako hlavní riziko protilátkami zprostředkované a T-buňkami zprostředkované rejekce.

Imunopatogeneze

Humorální odpověď štěpu je výsledkem rozpoznávání „non-self“ dárcovských HLA antigenů a rozvoj dárcovskyspecifických anti-HLA protilátek (DSA). Hlavní histokompatibilní komplex pozůstává ze tří lokusů I. třídy (HLA- A, -B, -C) a devíti lokusů antigenů II. třídy (alfa a beta řetězce HLA -DR, -DP, -DQ), které jsou tvořeny více než 10 000 sekvencemi nukleotidů, které kodují více než 700 unikátních proteinů (Thomas KA. a kol., 2015)¹⁷. Výsledkem tohoto extrémního polymorfismu je, že vícero aminokyselin je přítomno na terciální struktuře HLA a významnost je závislá na konstituci a uspořádání na epitopu HLA molekuly. Předtransplantační matching epitopů je možno využít v redukci de novo DSA strategii (Wiebe C. et al., 2013; Geneugelijk K. et al., 2015)^{18 19}.

Patogenní pro vznik rejekce mohou být i non-HLA protilátky, jako například anti-endotheliální protilátky, protilátky proti angiotenzinu II receptoru 1, které jsou nezávislým rizikovým faktorem ztráty štěpu, které jsou asociované s histologickými známkami AMR bez průkazu DSA (Giral M. et al., 2013; Taniguchi M. et al., 2013; Banasik M. et al., 2014; Lee J. et al., 2015)^{20 21 22 23}. Obdobné výsledky přežívání štěpů pacientů jsou při detekci MICA protilátek (major histocompatibility complex class I-related chain A) (Terasaki PI. Et al., 2007)²⁴. Mnoho antiendotheliálních protilátek může zahrnovat agrin, vimentin, perlecan endoglin, Fms-like tyrosin kináza-3 ligand, EGF like repeats a discoidin I-like doménu 3, intercelulární adhezivní molekula 4 a další komponenty (Jacscon AM. et al., 2015)²⁵.

Protilátky navázané na povrchu endotelu jsou mediované anti-inflamatorními a proinflamatorními mechanismy přes klasickou komplementovou dráhu (Sheena JH., Heeger PS., 2015)²⁶. Štěpným produktem komplementu vznikají chemoatraktanty, které společně s lymfocyty a terminální složkou komplementu vytváří MAC, který ochraňuje endotheliální buňku před jej osmotickou lýzou (Drachenberg CB., Papadimitriou JC., 2013)²⁷. Endotheliální buňky jsou stimulovány Willebrandovým faktorem a rychlou vazbou trombocytů (Kuo HH. Et al., 2015)²⁸ při zánětu a poškození endotelu. Protilátky jsou taktéž navázané pomocí Fc části receptoru na monocyty, makrofágy, neutrofilů a NK buňky (Thomas KA. et al., 2015)¹⁷. Důležitou roli hraje na protilátkách závislá buněčná toxicita, zejména NK buňky, které byly popsány microarray analýzou v biopsiích renálních štěpů při AMR.

Představují komplement nezávislé C4d negativní mechanismy poškození graftu. Spojením sFc receptoru s NK buňkami způsobí uvolnění cytotoxických granúl a stimuluje produkci cytokinů, jako jsou TNF- α , IFN- γ (Resch T. a kol., 2015)²⁹. Rozdíl v glykosylaci a sialylaci Fc části může alterovat afinitu Fc receptoru, která se podílí na patogenezi tvorby protilátek (Malard- Castagnet S. et al., 2016)³⁰.

Diagnóza

Diagnostika akutní AMR je závislá na pochopení patofyziologických mechanismů, které vznikají při poškození štěpu a použití nových diagnostických technik. Revidované klasifikační schéma (Banff 2013) zahrnuje diagnostická kritéria vzniku akutní AMR. 1. přítomnost DSA, 2. evidence jejich interakce s vaskulárním endothelem a 3. poškození tkáně (Haas M. et al., 2014)³¹.

DSA

Vznik hyperakutní rejekce v minulosti bylo zapříčiněno přítomností anti-HLA protilátek, které se testovaly pomocí buněčných technik. Pozdější využití solid-phase assay a single-antigen bead assay nám umožnilo rozpoznat potognomické protilátky s cílem zamezit vzniku rejekce s abruptním průběhem, která vedou ke ztrátě štěpu. Vysoký stupeň senzitivity u single-antigen bead assay pro klinickou interpretaci vyvolává mnoho otázek a postupů zejména u nemocných s vysokým imunologickým rizikem. Střední intenzita fluorescence (Mean Fluorescence Intensity, MFI) představuje nejlepší „semi-quantitativní“ popis síly protilátky. Beads (kuličky) mohou také obsahovat denaturované HLA antigeny, které určují patogenicitu a mohou nadhodnocovat senzitivitu (Visentin J. a kol., 2014)³². Mnoho nemocných má inhibitory, které falešně snižují hodnotu MFI, včetně HLA protilátek, které jsou navázané na komplement a mohou blokovat místo detekce protilátky, tento jev se nazývá „pro-zone efekt“. Jeho zamezení dochází, když jsou séra „předlčena“ s EDTA nebo doplňujícím vyšetřením s komparací C1q testu.

Interakce s vaskulárním endotelem

Vaskulární endotel představuje biologickou komunikaci mezi dárcovskou tkání a protilátkami příjemce. Protilátky vedou k aktivaci klasické komplementové cesty. C4d je štěpným produktem aktivace složky komplementu C4, která je kovalentně navázaná na endotel buněk štěpu, poškození štěpu závislé na komplementu vyústí do poruchy funkce bazální membrány (Feucht HE. et al., 1993)². Kromě C4d pozitivních akutních AMR, existuje fenotyp C4d negativních akutních AMR. Sis B. a kol., 2010³³ zjistili, že s endothelem-asociovaný transkriptom (ENDAT), při pozitivních DSA a histologických změnách potvrzujících AMR jsou C4d negativní formy AMR (Sis B. et al., 2010)³³.

Poškození tkáně

Histologicky se poškození tkáně projevuje jako mikrovaskulární inflamace vyjádřena jako peritubulární kapilaritida (ptc > 0) a glomerulitida (g > 0), trombotická mikroangiopatie, fibrinoidní nekróza arteriol (v³-léze), akutní tubulární atrofie bez jasné příčiny (Haas M., 2012)³⁴. Intimální arteritida nebo v-léze má specifické postavení v klasifikaci AMR, v minulosti se nález hodnotil jako čistá T-buňkami zprostředkovaná rejekce (TCMR), nyní je v aktualizované Banffské klasifikaci z roku 2013 nález hodnocen akutní poškození tkáně při AMR, intimální arteritida (v > 0). Vysvětlení je dáno lézí, která je demonstrována CD68 pozitivními makrofágy, která je asociována s 3x vyšším rizikem ztráty štěpu v porovnání AMR bez intimální léze. Lefaucheur C. a kol., 2013³⁵ popisují, že smíšená rejekce TCMR a AMR tvoří většinu humorálních rejekcí. Zajímavé je, že mnoho nemocných s v-lézí mělo molekulární profil bez přítomnosti rejekce. Je důležité správně interpretovat TCMR v kontextu doby od transplantace a přítomnosti DSA.

Nové techniky

Biopsie štěpu představuje zlatý standard při hodnocení rejekce štěpu, měření DSA, C4d barvení a histologické vyšetření má své limity. Přínosem k upřesnění diagnostiky a stratifikace rizika je využití „molekulárního mikroskopu“. Sis B. a kol., 2009³⁶ zjistili, že vysoká exprese ENDAT umožňuje lepší predikci ztráty štěpu než stanovení C4d (71 % vs. 31 %), jako problém se jeví nízká specifita (71 % vs. 94 %) (Sis a kol. 2009)³⁶. Loupy A. a kol., 2014³¹ přidali ke skórovacímu systému AMR pomocí molekulárního mikroskopu i endoteliální selektivní DSA transkriptom ke konvenčním metodám stanovení časně AMR a zjistili, že nezávisle predikuje ztrátu štěpu. Využití molekulárního mikroskopu nám umožní lépe řídit, resp. „ušít na míru“ imunosupresivní léčbu (Loupy A. et al., 2014)³¹. Ve fázi výzkumu je obdobně využít krve nebo moči ke stanovení genového transkriptomu (HA M., Kim VN., 2014; Ong SG. et al., 2015)^{37,38}.

Další neinvazivní diagnostika je stanovení volné frakce dárcovské DNA v periferní krvi (donor-derived cell-free DNA (cf-DNA)). Studie DART z roku 2017 stanovovala cf-DNA u 242 biopsií (204 indikačních) s negativní prediktivní hodnotou AMR 96 % při cut-off 1 % v krvi příjemce, avšak pozitivní prediktivní hodnota byla pouze 44 % (Bloom RD. et al., 2017)³⁹. Clark WF., Huang SS., 2019⁴⁰ stanovili cut-off 0,74 % cf-DNA u 63 indikačních biopsií a zjistili pozitivní prediktivní hodnotu AMR 69 % s negativní prediktivní hodnotou 100 %, problém této studie je, že nerozlišila samotnou AMR a kombinovanou AMR s podílem T-buněčné rejekce.

Prognóza a stratifikace rizika

Nemocní po transplantaci ledviny s anamnézou akutní AMR mají signifikantně horší prognózu přežívání funkce štěpu v porovnání s nemocnými, kteří mají v anamnéze akutní TCMR nebo neměli žádnou rejekci. Orandi B.J. a kol., 2016⁴¹ identifikoval 6 % nemocných s akutní AMR do 1 roku od transplantace ledviny. Jejich 5leté přežití štěpu s diagnózou akutní AMR ve srovnání se zdravými kontrolami bylo 69 %, resp. 92,5 %. Dörje C. a kol., 2013⁴² poukazuje na čas vzniku AMR. Ztrátu štěpu po 4 letech u nemocných s AMR, která byla do 3 měsíců (medián 10 dní) od transplantace byla 25 % v porovnání s nemocnými, u kterých byla diagnostikována pozdní AMR (více než 3 měsíce od transplantace, medián 22 měsíců), která činila 40 %. Transplantace mezi HLA inkompatibilními páry zvyšuje riziko vzniku akutní AMR až na 50 %, závisí na míře inkompatibility či použití desensitizační léčby (Dörje C. et al., 2013)⁴². Malheiro J. a kol., 2015⁴³ publikovali, že DSA více než 3 000 MFI jsou asociovány s rozvojem akutní AMR a suma všech DSA více než 11 000 MFI má specifitu 92,3 % pro predikci vzniku akutní AMR (Malheiro J. et al., 2015)⁴³.

Preformované DSA vedou k aktivaci komplementu, který poškozují transplantovaný orgán. DSA, které jsou navázány pomocí C1q složky komplementu, aktivují klasickou cestu komplementové kaskády. Loupy a kol. testovali 1016 nemocných, kteří měli pozitivní C1q test a zjistili, že tyto protilátky zvyšují riziko výskytu akutní AMR, závažně postihují štěp a čtyřnásobně zvyšují riziko ztráty štěpu (Loupy A. et al., 2013)⁴⁴. Je důležité stanovit podtřídy IgG, speciálně IgG1 a IgG3, které váží komplement a představují další rizikový faktor pro vznik akutní AMR. Lefaucheur C a kol., 2015 vyšetřili 125 nemocných, kteří vyvinuli DSA jeden rok po transplantaci a zjistili, že pacienti s imunodominantními DSA ve třídě IgG3 vyvinuli rychleji rejekci v důsledku zvýšení poškození mikrocirkulace s pozitivitou C4d, které představují většinu AMR (Lefaucheur C. et al., 2015)⁴⁵. I přes uvedená data není jasné, zda fixace komplementu skutečně může zastoupit měření koncentrace protilátek (Guidicelli G. Et al., 2015)⁴⁶.

Před zavedením C4d negativní formy AMR do klasifikace mnoho dat z literatury ukazovalo na horší přežívání štěpů při C4d pozitivitě (Herzenberg LA. et al., 2000; Lederer JA., et al., 2001)^{47 48}. Kapilaritida C4d představuje riziko akutní a závažní formy AMR. Kikic Ž. a kol., 2015⁴⁹ analyzovali 1976 renálních biopsií a zjistili, že nemocní s C4d pozitivitou s nebo bez histologických známek AMR měli horší přežívání štěpů (Kikic Ž. et al., 2015)⁴⁹. V protikladu s publikovanými daty je, že mikrovaskulární inflamace s pozitivitou C4d má značný prognostický význam.

Léčba

Principem léčby je inhibice různých mechanismů cest vedoucích k AMR, které indukují poškození štěpu a zahrnují inaktivaci B buněk (rituximab, splenektomie), protilátky produkující plazmatické buňky (bortezomib), odstraňování protilátek a imunomodulace (výměny plazmy, IVIG), inhibice protilátek, které indukují terminální komplementovou aktivaci (eculizumab). I přes mnohé léčebné zásahy existuje pouze málo dat, které podporují kombinační léčbu s jasným benefitem pro pacienta. Od roku 1950 do roku 2011 bylo provedeno pouze 12 kontrolovaných studií s nízkým počtem pacientů (od 5 do 23 nemocných s různými zařazovacími kritérii). Všichni autoři přijali závěry, že existují léčebné protokoly s nízkou evidencí efektivity.

I přes limitovaná data však bylo dosaženo konsenzu, že provedení plazmaferéz a aplikace IVIG je léčebným standardem, tak jako jsme to potvrdili i v naší studii (Archdean P. et al., 2011)⁵⁰. Otázkou je strategie dávkování a počet provedených procedur. I přes nízkou evidenci účinnosti PP + IVIG Food and Drug Administration (FDA) pracovní skupina pro AMR v roce 2017 (Velidedeoglu E. et al., 2018)⁵¹ a KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes v roce 2010 (Kasiske BL. et al., 2010)⁸ přijali jako standard of care v léčbě akutní aktivní AMR. Zlepšení krátkodobých výsledků potvrzují studie Rocha PN. et al., 2003⁵², Lefaucheur C. et al., 2009⁵³, Montgomery RA., et al., 2000⁵⁴, Böhmig G. et al., 2007⁵⁵. Dlouhodobý účinek je variabilní (Schinstock CA. et al., 2020)⁵⁶. Přidatná léčba specifickou inhibicí B lymfocytů byla opakovaně diskutována, taktéž máme limitovaná data s malou kontrolní skupinou. Studie RITUX-ERA, multicentrická dvojitě zaslepená placebom kontrolovaná, porovnává rituximab s placebem v kombinaci PF+ IVIG u 38 nemocných 1 rok po transplantaci ledviny s diagnózou akutní AMR (Sautenet B. et al., 2016)⁵⁷. Renální funkce byla zlepšena u obou skupiny ve 12. dni léčby, nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v hodnotách sérového kreatininu, proteinurii a hodnotách imunodominantních DSA ve 12. měsíci. Avšak nemocní, kteří byli léčeni rituximabem měli více imunodominantních DSA s MFI méně než 1 500 po léčbě. Obě skupiny zaznamenaly pokles mikrovaskulární inflamace (g+ptc) 1 měsíc po léčbě, ale tento trend pokračoval v rituximabové skupině i 6 měsíců po léčbě, kde placebová skupina měla rebound mikrovaskulární inflamace, podobně jako před započatím léčby. Je tedy možné konstatovat, že rituximab má význam při zmírnění přechodu z akutní do chronické formy AMR a zlepšuje dlouhodobé přežití ve štěpu.

Bortezomib je známý při využití v desensitizačních protokolech a v léčbě akutní formy AMR. Cílem léčby je inhibovat tvorbu plazmatických buněk, taktéž nemáme dostatek dat k potvrzení efektivity a účinnosti léčby (Trivedi HL. et al., 2009; Walsh RC. et al., 2010; Walsh RC. et al. 2011; Flechner SM. Et al., 2010; Nguyen S. et al.,

2014)^{58 59 60 61 62}. Walsh a kol. popisují podávání 4 cyklů bortezomibů v 11 dnech, před každou dávkou byla provedena plazmaferéza s odstupem 72 hodin. Tenhle protokol byl pro nás inspirací v léčbě rezistentní akutní AMR. Walsh a kol. léčili 19 nemocných s tímhle protokolem společně s aplikací 1 dávky rituximabu. Výsledkem bylo zlepšení renální funkce a snížení DSA u pacientů do 6 měsíců i nad 6 měsíců po transplantaci ledviny tj výsledky byli povzbuzující v léčbě akutní a pozdní AMR. Flechner a kol. popisují zlepšení přežívání štěpů u nemocných, kteří byli léčeni bortezomibem u méně závažných postižení štěpu (kreatinin pod 265 $\mu\text{mol/l}$, s nízkou proteinurií pod 1 g/24 hod.).

Alternativní přístup využívající inhibice blokády terminálního komplementu pomocí eculizumabu je finančně velmi náročný, data navíc nejsou podpořena studiemi. Byla popsána kazuistická sdělení podporující záchranou léčbu refrakterní rejekce. Orandi a kol.⁶³ popisovali komparativní studii splenektomie vs. Eculizumab vs. Eculizumab a splenektomie u 24 nemocných se závažnou akutní AMR jako záchranou léčbu u nemocných, kteří byli transplantováni přes pozitivní cross-match (Orandi BJ. et al., 2014)⁶³. Nemocní byli sledováni 18 měsíců. Čtrnáct nemocných podstoupilo splenektomii, u 4 nemocných došlo ke selhání štěpu. Ve skupině s monoterapií eculizumabem se 4 nemocní museli vrátit do dialyzačního programu z celkového počtu 5, všech 5 nemocných, kteří byli léčeni kombinací eculizumab a splenektomie, měli funkční štěpy. Avšak protokol eculizumab + splenektomie byl provázen vyšším výskytem infekčních a chirurgických komplikací.

Závěrem lze říct, že kombinovaná léčba plazmaferézou, IVIG, rituximabem ev. bortezomibem může být účinná, avšak nelze říct, že je standardem léčby pro nedostatek klinicky kontrolovaných studií s dostatečným počtem pacientů.

V roce 2016 Orandi BJ. a kol.⁴¹ publikoval práci, kde využil k léčbě akutní AMR kromě PF a aplikace IVIG navíc podání C1 esterázového inhibitoru ve 2 dávkách a zjistil, že 20. den po transplantaci ledviny měli nemocní trend ke zlepšené renální funkce v porovnání s placebem a 6 měsíců od zahájení léčby C1 inhibitorem nemocní neměli v biopsii prokázanou TG. Francouzská skupina autorů (Viglietti D. et al., 2016)⁶⁴, ke konvenční léčbě PF/IVIG přidala i aplikaci rituximabu, pokud tato léčba nebyla úspěšná, tak kromě C1 esterázového inhibitoru nemocné léčili i s vysokými dávkami IVIG (2 g/kg tělesné hmotnosti) 1x měsíčně, celkem 6x. Všichni nemocní měli pokles DSA a snížení positivity infiltrace C4d, u skupiny léčené C1 inhibitorem bylo zaznamenáno dosažení signifikantně lepší glomerulární filtrace 6 měsíců po transplantaci ledviny.

Jordan SC. et al., 2017⁶⁵ publikovali možnost desenzitizace nemocných ve vysokém imunologickém riziku pomocí IgG degradujícího enzymu odvozeného od bakterie *Streptococcus pyogenes* (IdeS). IdeS je endopeptidáza, která štěpí lidský IgG na F (ab') a Fc fragmenty inhibující na komplementu závislou cytotoxicitu a na protilátce závislou buněčnou cytotoxicitu. Jedenáct nemocných ve Švédsku a 14 pacientů v USA dostalo IdeS v intravenózní infuzi před HLA inkompatibilní transplantací ledviny. Po 6 hodinách byl zaznamenán dramatický pokles IgG a anti HLA protilátek, avšak po 7 dnech byl pozorován opětovný nárůst DSA. Deset nemocných vyvinulo AMR (v době od 2 týdnů do 5 měsíců po transplantaci ledviny s dobrou odpovědí na léčbu AMR) a 1 nemocnému selhal štěp z důvodu non-HLA IgM a IgA zprostředkovaní rejekce. Celkem bylo zaznamenáno 38 závažných nežádoucích událostí u 15 nemocných.

I nadále zůstává klinickým problémem chronická protilátkami zprostředkovaná rejekce. Studie Borteject nepotvrdila účinnost bortezomibu (Eskandry F. et al., 2018)⁶⁶ a klinická studie s tocilizumabem poukazuje na efektivitu za cenu závažných infekčních komplikací (Vo, 2015)⁶⁷. Příslibem se jeví v prevenci rozvoje cAMR clazakizumab, který je ve stadiu klinického testování.

Prevence

Hlavním cílem prevence je minimalizovat senzitivizaci nemocných, tj. vyhnout se podávání krevních transfuzí, alokovat orgán s co nejvíce shodami v HLA systému, využívat program párových výměn s cílem najít nejvhodnějšího imunologického dárce. Nezbytné je rovněž dodržení pokynů transplantačního centra v užívání imunosupresivní léčby s cílem minimalizovat nonadherenci, která je často příčinou ztráty štěpu v důsledky pozdní AMR.

7. Závěry

1. Léčba kombinací plazmaferéz a intravenózních imunoglobulinů představuje bezpečnou a účinnou terapii akutní AMR, což se projevilo významně lepším přežíváním štěpů transplantovaných ledvin a snížením incidence akutní rejekce v rebiopsiích.

Terapeutický protokol založený na podávání bortezomibu při léčbě rezistentní AMR byl bezpečný a dobře tolerován. Nepozorovali jsme život ohrožující komplikace jako oportunní infekce nebo maligní onemocnění.

Střední doba přežívání štěpů nemocných s akutní rezistentní AMR byla srovnatelná s přežíváním štěpů po opakovaných transplantacích.

Vzhledem k možné toxicitě bortezomibu je nutné provést další studie ke stanovení profilu toxicity.

2. Pomocí microarray jsme porovnali transkriptomický profil C4d pozitivních biopsií pacientů po HLA inkompatibilní či ABO inkompatibilní transplantaci s C4d negativními biopsiemi pacientů po HLA kompatibilní transplantaci s normálním nálezem a stabilní funkcí.

U ABOi skupiny byla zvýšená exprese transkriptů asociovaných s GO termínem mitochondrion a u HLAi skupiny s GO termíny oxidation and reduction, carboxylic and organic acid catabolic processes a několik GO termínů souvisejících se skupinou solute carrier family genes.

Transkripty zvýšené u kontrolní skupiny byly zastoupeny méně, v 31 % (v porovnání s ABOi skupinou) a 40 % (v porovnání s HLAi skupinou) ze všech deregulovaných genů. Tyto transkripty se zvýšenou expresí u C4d negativních nálezu v porovnání s ABOi skupinou byly asociovány s GO termíny defense response, response to wounding, inflammatory response a complement activation. Zatímco transkripty zvýšené u C4d negativních kontrol v porovnání se subklinickou AMR byly asociovány s GO termíny proteinaceous extracellular matrix, extracellular matrix and collagen.

3. Srovnáním koncentrace cytokinu BAFF před a po transplantaci ledviny jsme nezjistili statisticky významný rozdíl mezi pacienty, kteří vyvinuli akutní rejeckci oproti nemocným, kteří byli bez známek akutní rejekce. Hodnoty BAFF v době AMR byli signifikantně nižší u nemocných, kteří měli současně kombinovanou AMR a ACR než u pacientů bez rejekce. Nemocní, kteří měli pouze akutní AMR, měli trend k nižším koncentracím BAFF. Nepozorovali jsme žádnou korelaci hodnot BAFF při AMR s produkcí DSA. Naše měření podporují myšlenku, že solubilní BAFF může být pomocným markerem probíhající AMR, zejména při současně přítomné protilátkami zprostředkované rejeckci v kombinaci s akutní celulární rejeckci po transplantaci ledviny.

4. Vyšší incidence vzniku akutní AMR je asociována u nemocných po opakovaných transplantacích. Hodnota solubilního CD30 před a po transplantaci ledviny nekoreluje s přežíváním štěpu. Pozorovali jsme tendenci k vyšší incidenci AMR u nemocných před retransplantací s elevací sCD30 (≥ 100 U/ml). Nebyla prokázána korelace mezi sCD30 a výskytem AMR u prvních transplantací, avšak v případech pozitivních hodnot sCD30 a při přítomnosti anti-HLA protilátek dochází k vyšší incidenci vzniku AMR.

Samotná koncentrace HGF není asociována s incidencí AMR v jakékoliv době před a po transplantaci, také nebyla nalezena korelace mezi HGF a přežíváním štěpů.

Nemocní s nízkými hodnotami HGF a vyššími hodnotami sCD30 před transplantací mají vysoké riziko rozvoje AMR.

8. Literatura

1. Feucht HE, Felber E, Gpkel MJ, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol.* 1991;86(3):464-470.
2. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 1993;43(6):1333-1338.
3. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(10):2208-2214.
4. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. *Am J Transplant.* 2008;8(4):753-760. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x
5. Feucht HE. Complement C4d in Graft Capillaries - the Missing Link in the Recognition of Humoral Alloreactivity. *Am J Transplant.* 2003;3(6):646-652.
6. Halloran PF, Madrenas J. Regulation of MHC transcription. *Transplantation.* 1990;50(5):725-738.

7. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12(2):388-399.
8. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, et al. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int*. 2010;77(4):299-311.
9. Carlin Walsh R, Alloway RR, Girnita AL, Steve Woodle E. Proteasome inhibitor-based therapy for antibody-mediated rejection. *Kidney Int*. 2012;81(11):1067-1074.
10. Mengel M. What Is the Significance of Subclinical Inflammation in Human Renal Allografts? It Depends! *Transplantation*. 2012;93(1):22-23.
11. Touzot M, Couvrat-Desvergnés G, Castagnet S, et al. Differential Modulation of Donor-Specific Antibodies After B-Cell Depleting Therapies to Cure Chronic Antibody-Mediated Rejection. *Transplantation*. 2015;99(1):63-68.
12. Mahmoud K, Opelz G, Pelzl S, et al. Evaluation of Hepatocyte Growth Factor as a Sensitive Marker for Early Detection of Acute Renal Allograft Rejection. *Transplantation*. 2007;83(8):1035-1040.
13. Osickova K, Parikova A, Maluskova J, Fronek J, Viklicky O. Similar Microvascular Inflammation and Tubulointerstitial Injury in ABO-Incompatible and Matched ABO-Compatible Kidney Allografts. *Transplant Proc*. 2018;50(5):1305-1309.
14. Hrubá P, Krejčík Z, Stranecký V, et al. Molecular Patterns Discriminate Accommodation and Subclinical Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2019;103(5).
15. Iwasaki O, Noma K. Global genome organization mediated by RNA polymerase III-transcribed genes in fission yeast. *Gene*. 2012;493(2):195-200.
16. Wehmeier C, Hönger G, Cun H, et al. Donor Specificity but Not Broadness of Sensitization Is Associated With Antibody-Mediated Rejection and Graft Loss in Renal Allograft Recipients. *Am J Transplant*. 2017;17(8):2092-2102.
17. Thomas KA, Valenzuela NM, Gjertson D, et al. An Anti-C1s Monoclonal, TNT003, Inhibits Complement Activation Induced by Antibodies Against HLA. *Am J Transplant*. 2015;15(8):2037-2049.
18. Wiebe C, Pochinco D, Blydt-Hansen TD, et al. Class II HLA Epitope Matching-A Strategy to Minimize De Novo Donor-Specific Antibody Development and Improve Outcomes. *Am J Transplant*. 2013;13(12):3114-3122.
19. Geneugelijck K, Hönger G, van Deutekom HWM, et al. Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes Presented by HLA-DRB1 Are Related to HLA Antibody Formation During Pregnancy. *Am J Transplant*. 2015;15(12):3112-3122. doi:10.1111/ajt.13508
20. Giral M, Foucher Y, Dufay A, et al. Pretransplant Sensitization Against Angiotensin II Type 1 Receptor Is a Risk Factor for Acute Rejection and Graft Loss. *Am J Transplant*. 2013;13(10):2567-2576.
21. Taniguchi M, Rebellato LM, Cai J, et al. Higher Risk of Kidney Graft Failure in the Presence of Anti-Angiotensin II Type-1 Receptor Antibodies. *Am J Transplant*. 2013;13(10):2577-2589.
22. Banasik M, Boratyńska M, Kościelska-Kasprzak K, et al. The impact of non-HLA antibodies directed against endothelin-1 type A receptors (ETAR) on early renal transplant outcomes. *Transpl Immunol*. 2014;30(1):24-29.
23. Lee J, Park Y, Kim BS, et al. Clinical Implications of Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies in Antibody-mediated Rejection Without Detectable Donor-specific HLA Antibodies After Renal Transplantation. *Transplant Proc*. 2015;47(3):649-652. doi:10.1016/j.transproceed.2014.11.055
24. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year Follow-up of a Prospective Trial of HLA and MICA Antibodies on Kidney Graft Survival. *Am J Transplant*. 2007;7(2):408-415. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01644.x
25. Jackson AM, Sigdel TK, Delville M, et al. Endothelial Cell Antibodies Associated with Novel Targets and Increased Rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(5):1161-1171.
26. Sheen JH, Heeger PS. Effects of complement activation on allograft injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(4):468-475.
27. Drachenberg CB, Papadimitriou JC. Endothelial Injury in Renal Antibody-Mediated Allograft Rejection. *Transplant J*. 2013;95(9):1073-1083.
28. Kuo H-H, Fan R, Dvorina N, Chiesa-Vottero A, Baldwin WM. Platelets in Early Antibody-Mediated Rejection of Renal Transplants. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(4):855-863. doi:10.1681/ASN.2013121289
29. Resch T, Fabritius C, Ebner S, Ritschl P, Kotsch K. The Role of Natural Killer Cells in Humoral Rejection. *Transplantation*. 2015;99(7):1335-1340.
30. Malard-Castagnet S, Dugast E, Degauque N, et al. Sialylation of antibodies in kidney recipients with de novo donor specific antibody, with or without antibody mediated rejection. *Hum Immunol*. 2016;77(11):1076-1083.

31. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions. *Am J Transplant*. 2014;14(2):272-283.
32. Visentin J, Vigata M, Daburon S, et al. Deciphering Complement Interference in Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody Detection With Flow Beads Assays. *Transplantation*. 2014;98(6):625-631.
33. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. *Am J Transplant*. 2010;10(3):464-471.
34. Haas M. Pathologic features of antibody-mediated rejection in renal allografts. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(3):264-271.
35. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet*. 2013;381(9863):313-319. doi:10.1016/S0140-6736(12)61265-3
36. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial Gene Expression in Kidney Transplants with Alloantibody Indicates Antibody-Mediated Damage Despite Lack of C4d Staining. *Am J Transplant*. 2009;9(10):2312-2323.
37. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-524.
38. Ong S-G, Lee WH, Kodo K, Wu JC. MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;88:3-15. doi:10.1016/j.addr.2015.04.004
39. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(7):2221-2232.
40. Clark WF, Huang SS. Introduction to therapeutic plasma exchange. *Transfus Apher Sci*. 2019;58(3):228-229.
41. Orandi BJ, Alachkar N, Kraus ES, et al. Presentation and Outcomes of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Am J Transplant*. 2016;16(1):213-220.
42. Dörje C, Midtvedt K, Holdaas H, et al. Early Versus Late Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplant Recipients. *Transplant J*. 2013;96(1):79-84.
43. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, et al. Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transpl Immunol*. 2015;32(2):66-71.
44. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival. *N Engl J Med*. 2013;369(13):1215-1226. doi:10.1056/NEJMoa1302506
45. Racusen L, Lefaucheur C. Renal Allograft Rejection: Pieces of the Puzzle. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(5):1004-1005.
46. Visentin J, Guidicelli G, Moreau J-F, Lee J-H, Taupin J-L. Deciphering allogeneic antibody response against native and denatured HLA epitopes in organ transplantation. *Eur J Immunol*. 2015;45(7):2111-2121.
47. Herzenberg LA, De Rosa SC, Herzenberg LA. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today*. 2000;21(8):383-390.
48. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg*. 2001;193(3):237-244.
49. Kikić Ž, Kainz A, Kozakowski N, et al. Capillary C4d and Kidney Allograft Outcome in Relation to Morphologic Lesions Suggestive of Antibody-Mediated Rejection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(8):1435-1443.
50. Archdeacon P, Chan M, Neuland C, et al. Summary of FDA Antibody-Mediated Rejection Workshop. *Am J Transplant*. 2011;11(5):896-906.
51. Velidedeoglu E, Cavaillé-Coll MW, Bala S, Belen OA, Wang Y, Albrecht R. Summary of 2017 FDA Public Workshop. *Transplantation*. 2018;102(6):e257-e264.
52. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev*. 2003;196(1):51-64.
53. Lefaucheur C, Nochy D, Andrade J, et al. Comparison of Combination Plasmapheresis/IVIg/Anti-CD20 Versus High-Dose IVIg in the Treatment of Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant*. 2009;9(5):1099-1107.
54. Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, et al. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation*. 2000;70(6):887-895.
55. Böhmig GA, Wahrmann M, Regele H, et al. Immunoabsorption in Severe C4d-Positive Acute Kidney Allograft Rejection: A Randomized Controlled Trial. *Am J Transplant*. 2007;7(1):117-121.
56. Schinstock CA, Mannon RB, Budde K, et al. Recommended Treatment for Antibody-mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2020;104(5):911-922.

57. Sautenet B, Blancho G, Büchler M, et al. One-year Results of the Effects of Rituximab on Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplantation. *Transplantation*. 2016;100(2):391-399.
58. Trivedi HL, Terasaki PI, Feroz A, et al. Abrogation of Anti-HLA Antibodies via Proteasome Inhibition. *Transplantation*. 2009;87(10):1555-1561.
59. Walsh RC, Everly JJ, Brailey P, et al. Proteasome Inhibitor-Based Primary Therapy for Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection. *Transplantation*. 2010;89(3):277-284.
60. Walsh RC, Brailey P, Girnita A, et al. Early and Late Acute Antibody-Mediated Rejection Differ Immunologically and in Response to Proteasome Inhibition. *Transplantation*. 2011;91(11):1218-1226.
61. Flechner SM, Fatica R, Askar M, et al. The Role of Proteasome Inhibition With Bortezomib in the Treatment of Antibody-Mediated Rejection After Kidney-Only or Kidney-Combined Organ Transplantation. *Transplantation*. 2010;90(12):1486-1492.
62. Nguyen S, Gallay B, Butani L. Efficacy of bortezomib for reducing donor-specific antibodies in children and adolescents on a steroid minimization regimen. *Pediatr Transplant*. 2014;18(5):463-468.
63. Orandi BJ, Garonzik-Wang JM, Massie AB, et al. Quantifying the Risk of Incompatible Kidney Transplantation: A Multicenter Study. *Am J Transplant*. 2014;14(7):1573-1580.
64. Viglietti D, Lefaucheur C, Glotz D. Evidence for an important role of both complement-binding and noncomplement-binding donor-specific antibodies in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(4):433-440.
65. Jordan SC, Lorant T, Choi J, et al. IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):442-453.
66. Eskandary F, Regele H, Baumann L, et al. A Randomized Trial of Bortezomib in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(2):591-605. doi:10.1681/ASN.2017070818
67. Vo AA, Zeevi A, Choi J, et al. A Phase I/II Placebo-Controlled Trial of C1-Inhibitor for Prevention of Antibody-Mediated Rejection in HLA Sensitized Patients. *Transplantation*. 2015;99(2):299-308.

9. Seznam publikací

1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

- Slatinská, J., Honsová, E., Bürgelová, M., Slavčev, A., Viklický, O. Plasmapheresis and intravenous immunoglobulin in early acute humoral rejection of the renal allograft. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. 2009, **13**(2), 108-112. ISSN 1744-9979. **IF 1,140**.
- Slatinská, J., Slavčev, A., Honsová, E., Hrubá, P., Kratochvílová, I., Rohál, T., Viklický, O. Efficacy and safety of BORTEZOMIB treatment for refractory acute antibody-mediated rejection - a pilot study. *HLA*. 2018, **92**(Suppl. 2), 47-50. ISSN 2059-2302. e-ISSN 2059-2310. **IF 2,785**.
- Pavlová, Y., Viklický, O., Slatinská, J., Bürgelová, M., Süsal, C., Skibová, J., Honsová, E., Stříž, I., Kolesár, L., Slavčev, A. Soluble CD30 and Hepatocyte growth factor as predictive markers of antibody-mediated rejection of the kidney allograft. *Transplant immunology*. 2011, **25**(1), 72-76. ISSN 0966-3274. **IF 1,459**.
- Slavčev, A., Brožová, J., Slatinská, J., Sekerová, Z., Honsová, E., Skibová, J., Stříž, I., Viklický, O. Soluble BAFF cytokine levels and antibody-mediated rejection of the kidney allograft. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2016, **64**(Supplement 1), S47-S53. ISSN 0004-069X. e-ISSN 1661-4917. **IF 2,040**.
- Hrubá, P., Krejčík, Z., Stranecky, V., Malusková, J., Slatinská, J., Gueler, F., Gwinner, W., Brasen, J., Wohlfahrtová, M., Paríková, A., Osicková, K., Fronek, J., Seda, O., Prefertusová, L., Honsová, E., Viklický, O. Molecular patterns discriminate accommodation and subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 2019, **103**(5), 909-917. ISSN 0041-1337. e-ISSN 1534-6080. **IF 4,546**.
- Viklický, O., Slatinská, J., Novotný, M., Hrubá, P. Developments in immunosuppression. *Current opinion in organ transplantation*. 2021, **26**(1), 91-96. ISSN 1087-2418. e-ISSN 1531-7013. **IF 2,571** z r. 2019.
- Hrubá, P., Madill-Thomsen, K., Macková, M., Klema, J., Malušková, J., Voska, L., Paříková, A., Slatinská, J., Halloran, P., Viklický, O. Molecular patterns of isolated tubulitis differ from tubulitis with interstitial inflammation in early indication biopsies of kidney allografts. *Scientific reports*. 2020, **10**(1), art. no. 22220. ISSN 2045-2322. **IF 3,998** z r. 2019.
- Straňavová, L., Hrubá, P., Slatinská, J., Sawitzki, B., Reinke, P., Volk, H., Viklický, O. Dialysis therapy is associated with peripheral marginal zone B-cell augmentation. *Transplant immunology*. 2020, **60**(June), art. no. 101289. ISSN 0966-3274. **IF 1,624** z r. 2019.

Švachová, V., Sekerová, A., Hrubá, P., Týcová, I., Rodová, M., Čerčrdlová, E., Slatinská, J., Honsová, E., Stříž, I., Viklický, O. Dynamic changes of B-cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cells is associated with allograft rejection. *Transplant International*. 2016, **29**(5), 540-548. ISSN 0934-0874. e-ISSN 1432-2277. **IF 3,079**.

Viklický, O., Kryštůfková, E., Brabcová, I., Sekerová, A., Wohlfahrt, P., Hřibová, P., Wohlfahrtová, M., Sawitzki, B., Slatinská, J., Stříž, I., Volk, H., Reinke, P. B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2013, **95**(1), 148-154. ISSN 0041-1337. e-ISSN 1534-6080. **IF 3,535**.

Viklický, O., Hřibová, P., Volk, H., Slatinská, J., Petrášek, J., Bandúr, Š., Honsová, E., Reinke, P. Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010, **21**(1), 173-180. ISSN 1046-6673. **IF 8,288**.

Viklický, O., Paříková, A., Slatinská, J., Hanzal, V., Pagáčová, L., Honsová, E., Kieslichová, E., Janoušek, L., Froněk, J. Transplantace ledviny při inkompatibilitě krevní skupiny - úvodní zkušenosti programu. *Vnitřní lékařství*. 2015, **61**(7-8), 725-730.

Slatinská, J., Viklický, O. Protilátkami zprostředkovaná rejekce: současné pohledy na patofyziologii a terapii. *Aktuality v nefrologii*. 2014, **20**(1), 20-30.

Slatinská, J., Honsová, E., Bürgelová, M., Slavčev, A., Viklický, O. Plasmapheresis and Intravenous Immunoglobulin in the Treatment and Prevention of Antibody Mediated Rejection. *Transplantationsmedizin*. 2010, **22**(4), 277-281.

Slatinská, J., Honsová, E., Lyerová, L., Slavčev, A., Viklický, O. Akutní humorální rejekce transplantované ledviny. *Vnitřní lékařství*. 2007, **53**(3), 246-252.

2. publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace

Hrubá, P., Krejčík, Z., Dostalova, MM., Klema, J., Stranecky, V., Slatinska, J., Maluskova, J., Honsova, E., Viklicky, O. Molecular fingerprints of borderline changes in kidney allografts are influenced by donor category. *Frontiers in immunology [online]*. 2020, **11**(March), art. no. 423. ISSN 1664-3224. e-ISSN 1664-3224. **IF 5,085** z r. 2019.

Viklicky, O., Krivanec, S., Vavrinova, H., Berlakovich, G., Marada, T., Slatinska, J., Neradova, T., Zamecnikova, R., Salat, A., Hofmann, M., Fischer, G., Slavcev, A., Chromy, P., Oberbauer, R., Pantoflicek, T., Wenda, S., Lehner, E., Fae, I., Ferrari, P., Froněk, J., Boehming, GA. Crossing borders to facilitate live donor kidney transplantation: the Czech-Austrian kidney paired donation program - a retrospective study. *Transplant International*. 2020, **33**(10), 1199-1210. ISSN 0934-0874. e-ISSN 1432-2277. **IF 3,177** z r. 2019.

Rousse, J., Salama, A., Ben-arye, SL., Hrubá, P., Slatinska, J., Evanno, G., Duvaux, O., Blanchard, D., Yu, H., Chen, X., Bach, J., Padler-Karavani, V., Viklicky, O., Soullillou, J. Quantitative and qualitative changes in anti-Neu5Gc antibody response following rabbit anti-thymocyte IgG induction in kidney allograft recipients. *European Journal of Clinical Investigation*. 2019, **49**(4), art. no. e13069. ISSN 0014-2972. e-ISSN 1365-2362. **IF 3,481**.

Selby, N., Blankestijn, P., Boor, P., Combe, C., Eckardt, K., Eikefjord, E., Garcia-Fernandez, N., Golay, X., Gordon, I., Grenier, N., Hockings, P., Jensen, J., Joles, J., Kalra, P., Kraemer, B., Mark, P., Mendichovszky, I., Nikolic, O., Odudu, A., Ong, A., Ortiz, A., Pruijm, M., Remuzzi, G., Rorvik, J., De Seigneux, S., Simms, R., Slatinská, J., Summers, P., Taal, M., Thoeny, H. Magnetic resonance imaging biomarkers for chronic kidney disease: a position paper from the European Cooperation in Science and Technology Action Parenchima. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2018, **33**(Supplement 2), II4-II14. ISSN 0931-0509. e-ISSN 1460-2385. **IF 4,198**.

Straňavová, L., Hrubá, P., Girmanová, E., Týcová, I., Slavčev, A., Froněk, J., Slatinská, J., Reinke, P., Volk, H., Viklický, O. The effect of induction therapy on established CMV specific T cell immunity in living donor kidney transplantation. *Physiological Research*. 2018, **67**(2), 251-260. ISSN 0862-8408. e-ISSN 1802-9973. **IF 1,701**.

Týcová, I., Hrubá, P., Maixnerová, D., Girmanová, E., Mrázová, P., Straňavová, L., Zachoval, R., Merta, M., Slatinská, J., Kollár, M., Honsová, E., Tesař, V., Viklický, O. Molecular profiling in IgA nephropathy and focal and segmental glomerulosclerosis. *Physiological Research*. 2018, **67**(1), 93-105. ISSN 0862-8408. **IF 1,701**.

Zachoval, R., Borovička, V., Marada, T., Viklický, O., Froněk, J., Krhut, J., Janoušek, L., Slatinská, J., Nencka, P. The effects of diuresis, duration of dialysis and age on lower urinary tract function in urologically healthy male patients on the waiting list for kidney transplant. *Urology journal*. 2018, **15**(2), 49-54. ISSN 1735-1308. e-ISSN 1735-546X. **IF 1,463**.

Hrubá, P., Týcová, I., Krepsová, E., Girmanová, E., Sekerková, A., Slatinská, J., Stříž, I., Honsová, E., Viklický, O. Steroid free immunosuppression is associated with enhanced Th1 transcripts in kidney transplantation. *Transplant Immunology*. 2017, **42**(June 2017), 18-23. ISSN 0966-3274. **IF 1,655**.

Slavčev, A., Rybáková, K., Svobodová, E., Slatinská, J., Honsová, E., Skibová, J., Viklický, O., Stříž, I. Pre-transplant donor-specific Interferon-gamma-producing cells and acute rejection of the kidney allograft. *Transplant Immunology*. 2015, **33**(2), 63-68. ISSN 0966-3274. **IF 1,317**.

Janoušek, L., Kudla, M., Slatinská, J., Viklický, O., Froněk, J. Kidney transplant early venous complications managed by re-perfusion and re-transplantation - salvage procedure. *Bratislavské lékařské listy*. 2014, **115**(2), 101-102. ISSN 0006-9248. **IF 0,439**.

Sekerová, A., Krepsová, E., Brabcová, E., Slatinská, J., Viklický, O., Lánská, V., Stříž, I. CD14+CD16+and CD14+CD163+monocyte subpopulations in kidney allograft transplantation. *BMC Immunology*. 2014, **15**(February 6), art. No. 4. ISSN 1471-2172. **IF 2,481**.

Zavada, J., Pesickova, S., Rysava, R., Horak, P., Hrnčir, Z., Lukac, J., Rovensky, J., Vitova, J., Havrda, M., Rychlik, I., Boehmova, J., Vlasakova, V., Slatinska, J., Zadrazil, J., Olejarova, M., Tegzova, D., Tesar, V. Extended follow-up of the CYCLOFA-LUNE trial comparing two sequential induction and maintenance treatment regimens for proliferative lupus nephritis based either on cyclophosphamide or on cyclosporine A. *Lupus*. 2014, **23**(1), 69-74. ISSN 0961-2033. e-ISSN 1477-0962. **IF 2,197**.

Slatinská, J., Rohál, T., Wohlfahrtová, M., Viklický, O. Long-term follow-up of stable kidney transplant recipients after conversion from tacrolimus twice daily immediate release to tacrolimus once-daily prolonged release: A large single-center experience. *Transplantation Proceedings*. 2013, **45**(4), 1491-1496. ISSN 0041-1345. e-ISSN 1873-2623. **IF 0,984**.

Zachoval, R., Jarabák, J., Slatinská, J., Bürgelová, M., Sobotka, V., Vránová, J., Krhut, J. Dynamics of fertility in patients on waiting list for kidney transplantation. *Bratislavské lékařské listy*. 2013, **114**(12), 711-715. ISSN 0006-9248. **IF 0,446**.

Honsová, E., Lodererová, A., Slatinská, J., Bouček, P. Cured malakoplakia of the renal allograft followed by long-term good function: A case report. *Biomedical papers*. 2012, **156**(2), 180-182. ISSN 1213-8118. **IF 0,990**.

Zachoval, R., Jarabák, J., Slatinská, J., Bürgelová, M., Sobotka, V., Vránová, J. Parametry spermiogeneze a jejich vývoj u hemodialyzovaných pacientů do 49 let zařazených na čekací listinu k transplantaci. *Česká urologie*. 2012, **16**(3), 171-179. ISSN 1211-8729.

Viklický, O., Slatinská, J., Bürgelová, M., Vítko, Š., Urbanová, M., Lažanská, R., Hanzal, V., Bandúr, Š., Teplan, V., Matl, I., Janoušek, L., Honsová, E., Drastichová, M., Malý, J. Transplantace ledviny v IKEM. *Časopis lékařů českých*. 2011, **150**(1), 56-59.

Jachymova, M., Brabcova, I., Germanova, A., Slatinska, J., Mestek, O., Matl, I., Zima, T., Viklicky, O., Kalousova, M. A419C Polymorphism of Glyoxalase I Gene: Renal Function and Histological Findings at 12 Months after Renal Transplantation. *International journal of Nephrology and Urology*. 2010, **2**(4), 504-513.

Magicová, M., Novotný, M., Slatinská, J., Viklický, O. Hluboká žilní trombóza jako primární manifestace COVID 19 u pacienta po transplantaci ledviny. *Postgraduální nefrologie*. 2020, **18**(4), 38-40.

Petr, V., Slatinská, J., Viklický, O. Pozdní reparace akutního selhání ledvin. *Postgraduální nefrologie*. 2019, **17**(4), 32-33.

Schmalz, M., Slatinská, J., Viklický, O. Časná rekurence C3 glomerulopatie po transplantaci ledviny? *Postgraduální nefrologie*. 2018, **16**(4), 28-30. Rohál, T., Slatinská, J. Minimální změny glomerulů, nebo syndrom barona Prášila? *Postgraduální nefrologie*. 2014, **12**(4), 63-64.

Slatinská, J., Rajnochová Bloudíčková, S., Rohál, T., Brůžková, I., Hanzal, V., Vítko, Š., Viklický, O. Transplantace ledvin od žijících dárců. *Postgraduální medicína*. 2013, **15**(6), 662-667. ISSN 1212-4184.

Rajnochová Bloudíčková, S., Řepová, B., Slatinská, J., Vaňková, S. Transplantace ledviny u HIV pozitivního příjemce. *Postgraduální nefrologie*. 2012, **10**(2), 30-31.

Slatinská, J., Macháčková, K., Honsová, E. Časný záchyt Goodpastureovy choroby. *Postgraduální nefrologie*. 2012, **10**(4), 62-64.

Slatinská, J., Viklický, O., Froněk, J. Párová výměna ledvin k transplantaci]. *Postgraduální nefrologie*. 2012, **10**(1), 16.