

UNIVERZITA KARLOVA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Mgr. Petra Hrubá, PhD.

Transplantační laboratoř CEM IKEM, Praha

Využití transkriptomiky v molekulární patologii ledvinných štěpů

Habilitační práce

Praha 2021

## Poděkování

Děkuji především prof. MUDr. Ondřeji Viklickému, CSc., který mne přijal do Transplantační laboratoře IKEM a zasvětil do oboru Transplantologie. Jeho zaujetí a nadšení pro vědeckou práci je velkým hnacím motorem i pro moji práci. Děkuji zejména za možnost diskutovat s ním řešené projekty a klinické výsledky, a také za kritické poznámky, které mě nutí neustále na sobě pracovat.

Ráda bych poděkovala svým milým kolegyním z Transplantační laboratoře, zejména doktorce Ireně Brabcové, doktorce Evě Girmanové a doktorce Petře Mrázové za vytvoření příjemného pracovního prostředí vzájemné pomoci, inspirace a podpory.

Dále děkuji všem lékařům z Kliniky nefrologie TC IKEM, a to zejména doktorce Jance Slatinské, docentce Marianě Wohlfahrtové a docentce Aleně Paříkové za spolupráci na grantových projektech, podněty k práci a podporu při řešení projektů.

## Obsah

---

1. Transplantace ledviny.....	6
2. Patofyziologická a histologická klasifikace rejekcí .....	6
3. Využití transkriptomiky při diagnostice ledvinných štěpů .....	8
3.1. Princip microarray a RNA sekvenování .....	8
3.2. Využití microarray v diagnostice ledvinných štěpů.....	9
3.2.1. Technologie molekulárního mikroskopu (MMDx) .....	10
3.3. Využití RNA sekvenování v diagnostice ledvinných štěpů .....	10
3.4. Využití NanoString technologie v diagnostice ledvinných štěpů .....	11
3.5. Princip single-cell RNA sekvenování a možnosti využití v diagnostice .....	12
4. Hraniční změny ledvinných štěpů.....	13
5. Komentář k vlastním výsledkům.....	16
5. 1. Rizikové faktory selhání štěpu po diagnóze hraničních změn.....	16
5.1.1. Opožděná funkce štěpu, starší dárce ledviny a nález hraničních změn v období časně po transplantaci zhoršují 5leté přežití štěpu .....	16
5.1.2. Biomarkery zhoršení renální funkce po diagnóze hraničních změn .....	19
5.1.3. Vliv věku/typu dárce na expresní profil biopsií s časnými hraničními změnami. ....	21
5.1.4. Vliv intersticiálního zánětu na progresivní fenotyp hraničních změn .....	23
5.1.5. Identifikace progresivního fenotypu časných hraničních změn.....	27
5.2. Patofyziologie akomodace u ABO inkompatibilních transplantací ledvin .....	29
5.3. Určení fenotypu vaskulární rejekce .....	30
6. Souhrn.....	32
7. Reference .....	33
8. Vybrané komentované publikace .....	42

## Seznam zkratek

---

**ABMR** aktivní protilátkami-zprostředkovaná rejekce

**BL** hraniční změny (z angl. borderline changes)

**BKV** BK virus

**cg** transplantační glomerulopatie

**DGF** opožděná funkce štěpu (z angl. delayed graft function)

**DSA** dárcovsky-specifické protilátky (z angl. donor specific antibodies)

**ECD** dárce s rozšířenými kritérii (z angl. expanded criteria donor)

**eGFR** odhadovaná glomerulární filtrace

**ENDAT** genové transkripty asociované s endotelem

**g** glomerulitida

**i** intersticiální zánět

**ISO-T** izolovaná tubulitida

**I+T** intersticiální zánět s tubulitidou

**HLA** human leukocyte antigen

**HR** poměr rizik (z angl. hazard ratio)

**LD** žijící dárce (z angl. living donor)

**MMDx** diagnostický systém molekulárního mikroskopu (z angl. molecular microscope diagnostic system)

**mRNA** mediátorová ribonukleová kyselina

**OR** poměr šancí (z angl. odds ratio)

**PRA** panel-reaktivní protilátky

**ptc** peritubulární kapilaritida

**RT-qPCR** kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

**t** tubulitida

**rATG** králičí antithymocytární globulin

**SCD** dárce splňující standardní kritéria (z angl. standard criteria donor)

**TCMR** T buňkami-zprostředkovaná rejekce

**TMA** trombotická mikroangiopatie

**v** intimální arteritida (tzv. v – léze)

## Předmluva

---

Předkládaná habilitační práce je souhrnem publikovaných výsledků dosažených za období 2015- 2021 v Transplantační laboratoři CEM a na Klinice nefrologie IKEM.

V úvodu jsou krátce shrnuty aktuální výsledky programu transplantace ledvin a problematika rejekcí transplantovaného orgánu. Úvod je také zaměřen na popis standardní metody hodnocení stavu ledvinného štěpu pomocí histopatologické diagnózy, založené na Banffské klasifikaci, a jejím nedostatkům. Dále se věnuji popisu nejasných diagnóz, zejména problematice hraničních změn. Detailně jsou v úvodu rozvedeny molekulární metody, které lze využít pro zpřesnění patologického hodnocení štěpu.

Na úvod navazují komentáře k výsledkům, týkající se využití transkriptomiky v diagnostice ledvinných štěpů, publikované v odborných recenzovaných časopisech.

## 1. TRANSPLANTACE LEDVINY

---

Transplantace ledviny představuje pro pacienty s renálním selháním nejlepší způsob léčby. V České republice aktuálně žije přibližně 5000 pacientů s transplantovanou ledvinou, každým rokem se toto číslo zvyšuje o cca 500 pacientů. Více než polovina transplantací ledvin se provádí v IKEM. V 90 % se jedná o ledviny transplantované od zemřelých dárců, zbylých 10% tvoří příbuzenské nebo řetězové transplantace. Při použití nejnovějších imunosupresivních léčiv se dnes jednorozční přežívání ledvinných štěpů pohybuje kolem 90%, pětileté přežívání pak kolem 85 %<sup>1</sup>. Navzdory pokrokům v možnostech imunosupresivní léčby po transplantaci dochází u zhruba 10-15 % transplantovaných k rozvoji akutní rejeckce (odhojování štěpu). Akutní rejeckci, která se vyskytuje v období brzy po transplantaci, lze zvládnout pomocí správně zvolené antirejeckční léčby. Nesprávně léčená či nerozpoznaná akutní rejeckce ale může vést k rozvoji chronické rejeckce. Na chronickou rejeckci zatím spolehlivá léčba neexistuje a tak vede k progresi fibrózy a k postupnému selhávání štěpu. Z dlouhodobého hlediska patří chronická rejeckce spolu s nedodržíváním imunosupresivní léčby, rekurencí základního onemocnění a fibrózou mezi hlavní příčiny selhávání štěpů ledvin<sup>2</sup>.

## 2. PATOFYZIOLOGICKÁ A HISTOLOGICKÁ KLASIFIKACE REJEKČÍ

---

Při transplantaci tkáně od geneticky odlišného dárce vyvolávají alloantigeny imunitní odpověď příjemce, takzvanou rejeckci. Podle období po transplantaci, ve kterém se objevuje, rozlišujeme rejeckci akutní (v prvních 3-6 měsících po transplantaci) a chronickou, která se vyvíjí v průběhu několika měsíců až let po transplantaci. Z pohledu patofyziologie rozlišujeme rejeckci zprostředkovanou T buňkami (TCMR), protilátkami (ABMR) a smíšenou. U TCMR antigen prezentující buňky rozpoznají antigeny dárce, což vede k aktivaci T buněk a infiltraci štěpu T buňkami. U ABMR se vytvářejí protilátky proti antigenům dárce, a dochází k aktivaci komplementu. Tyto tzv. donor-specifické protilátky mohou být přítomny už před transplantací nebo se vytváří *de-novo* až po transplantaci.<sup>3</sup>

Diagnostika typu rejeckce je založena na histopatologickém zhodnocení bioptického vzorku ledviny patologem. Biopsie štěpu bývá indikována v případě zhoršení renální funkce (tzv. indikační biopsie), nebo se provádí tzv. protokolární biopsie s určitým odstupem od transplantace s cílem odhalit subklinickou rejeckci (bez zhoršené funkce štěpu). Na základě histopatologického vyšetření je stanovena diagnóza a podle ní nastavena odpovídající léčba.

Vyhodnocení histopatologického nálezu se řídí dle platné Banffské klasifikace. Ta byla poprvé zavedena v roce 1991<sup>4</sup> a je pravidelně aktualizována každé dva roky<sup>5-8</sup>. Je založena na skórovacím systému pro jednotlivé morfológické znaky, které jsou pak přisuzovány jednotlivým diagnózám.

Dle aktuální Banffské klasifikace<sup>8</sup> rozlišujeme humorální rejeckci (aktivní a chronickou aktivní ABMR) a T-buňkami zprostředkovanou rejeckci (akutní a chronickou aktivní TCMR). Aktivní ABMR je diagnostikována v případě průkazu akutního poškození tkáně (zánět

v peritubulárních kapilárách (ptc skóre), glomerulitida (g skóre), arteritida (v skóre), trombotická mikroangiopatie), průkazu interakce protilátek s endotelem (buď průkaz positivity C4d složky komplementu nebo zvýšená exprese ENDAT transkriptů) a průkazu donor specifických protilátek v séru pacienta. Chronická aktivní ABMR je navíc charakterizována přítomností transplantální glomerulopatie (cg skóre). Akutní celulární rejekce je dělena na typy I – III v závislosti na závažnosti intersticiálního zánětu (i skóre), tubulitidy (t skóre) a arteritidy (v skóre). Chronická aktivní TCMR je charakterizována přítomností zánětu v oblastech kůry s fibrózou a tubulární atrofií (i-IFTA skóre>2) současně se zánětem v kůře (ti skóre>2) a středně závažnou tubulitidou (t skóre>2). Pokud jsou zánětlivé změny mírnějšího rázu, a nesplňují kritéria Banffské klasifikace pro TCMR, jsou označeny jako *Banff Borderline – hraniční změny*.

Některé morfologické znaky jako např. glomerulitida, transplantální glomerulopatie nebo zánět v peritubulárních kapilárách jsou charakteristické pro určitý typ rejekce (v tomto případě protilátkami zprostředkované rejekce). Existují ale i znaky nespecifické, které se mohou vyskytovat u více diagnóz (jako například tubulitida<sup>9</sup>, intersticiální zánět<sup>10</sup> nebo vaskulární léze<sup>11</sup>. Vaskulární léze (intimální arteritida, v skóre) může být projevem jak humorální, tak závažnější formy T- buňkami zprostředkované rejekce (TCMRIIA, TCMRIIB, TCMRIII). Střední či závažná tubulitida a intersticiální zánět jsou charakteristické pro TCMR, mohou být ale i projevem BKV nefropatie. Naopak mírná tubulitida a intersticiální zánět, představují kategorii hraničních změn.

Pro volbu správné léčby je nezbytné odlišit, zda se jedná o T nebo B buňkami zprostředkovanou rejekci, případně o rejekci smíšenou. Akutní TCMR se standardně léčí pulzy methylprednisolonu intravenózně. V případě závažnějšího stupně TCMR (typ IIA a výše) nebo u rejekce rezistentní ke steroidům se pacientům podává antithymocytární globulin (rATG). Primárním cílem léčby akutní ABMR je odstranění protilátek<sup>12</sup>. Toho je dosaženo většinou kombinací plazmaferéz a podáním intravenózních imunoglobulinů. Léčba bývá doplněna pulzy steroidů či podáním rATG. U vysoce rizikových pacientů (retransplantace, vysoká hladina donor specifických protilátek (DSA), vysoká hladina panel reaktivních protilátek (PRA), refrakterní ABMR) se podává anti-CD20 monoklonální protilátka, která zabraňuje přeměně nezralých lymfocytů na plazmatické buňky produkující protilátky<sup>13</sup> a/nebo inhibitor proteasomu, Bortezomib, který cílí přímo na plazmatické buňky tvořící protilátky<sup>14</sup>. U hraničních změn se většinou přistupuje k léčbě pulzy steroidů, přestože se nejedná o rejekci. Nicméně řada hraničních změn by léčena být nemusela, a naopak některé hraniční změny mohou progredovat do TCMR a v případě refrakterní rejekce vyžadovat léčbu rATG. U vaskulární rejekce způsob léčby závisí na tom, zda se jedná o fenotyp buněčný či humorální. Někdy naopak nacházíme v biopsii štěpu morfologický znak, jako například C4d složku komplementu, který je sice typický pro ABMR, ale v případě pacientů se stabilní funkcí štěpu po ABO inkompatibilní transplantaci se jedná o tzv. akomodaci<sup>15</sup>, která nevyžaduje léčbu. V předkládané práci, jsou tyto nejasné diagnózy (hraniční změny, vaskulární léze a C4d pozitivita u akomodace) vyšetřovány pomocí transkriptomických metod (microarray, RNA sekvenování), které mohou významně přispět k zpřesnění diagnózy.

### 3. VYUŽITÍ TRANSKRIPTOMIKY PŘI DIAGNOSTICE LEDVINNÝCH ŠTĚPŮ

---

Moderním přístupem k posouzení typu a závažnosti rejekce je stanovení genové exprese v bioptickém vzorku ledvinného štěpu. Při různých typech poškození ledvinného štěpu jsou aktivovány odlišné biologické dráhy, což se projevuje tvorbou specifických mRNA. Vyzolováním RNA z bioptického vzorku tak můžeme vyhodnotit aktivitu genů souvisejících s danou diagnózou. Molekulární diagnostika je vhodným doplňkem klasického histopatologického vyšetření bioptického vzorku a může významně pomoci se zpřesněním diagnózy u problematických nálezů. Molekulární změny jsou v ledvinné tkáni detekovány mnohem dříve než je poškození patrné při vyšetření pomocí mikroskopu a může tedy pomoci s nastavením léčby a prevencí progresu poškození štěpu.

#### 3.1. PRINCIP MICROARRAY A RNA SEKVENOVÁNÍ

---

V současnosti nejpoužívanějšími metodami analýzy transkriptomu jsou RNA microarray a RNA sekvenování (RNAseq). Pokud chceme hodnotit jen vybrané menší sety genů, pak je nejlepší volbou metoda real-time PCR.

Microarray metoda je založena na hybridizaci biotinem značené komplementární RNA (cRNA) s próbami mikročipu. Po izolaci celkové RNA je RNA přepsána do cDNA a poté je *in-vitro* transkribována do cRNA současně se značením biotinem. Bylo vyvinuto několik platform microarray (Illumina, Affymetrix, Agilent), které se liší technologií připojování prób na čip, počtem vzorků, které lze aplikovat na jeden čip a speciálním skenerem čipů, specifickým pro danou platformu. Momentálně jsou dostupné pouze platformy Agilent a Affymetrix, protože firma Illumina orientuje výrobu už pouze na RNA sekvenování.

RNA sekvenování umožňuje osekvenování celého transkriptomu<sup>16</sup>. Při designu experimentu je třeba se rozhodnout, které RNA molekuly chceme studovat. Vzhledem k tomu, že ribozomální RNA představuje 90% celkové RNA, je výhodné ji z celkové RNA nejprve odstranit. Buď vyselektujeme pouze mRNA (tzv. pozitivní poly-A selekce) nebo odstraníme ribozomální RNA (tzv. negativní selekce nebo ribodeplece) a zůstane nám mRNA a nekódující RNA (lncRNA). Případně provedeme velikostní selekci a můžeme studovat mikro RNA (miRNA). Při poly-A selekci se RNA svým poly-A koncem naváže na oligo(dT) primery na magnetických kuličkách a z nich je po promytí posléze eluována. Tato metoda se doporučuje u experimentů, kde je cílem kvantifikovat zejména protein kódující geny<sup>17</sup>. U ribodeplece jsou pomocí hybridizace odstraněny RNA komplementární s ribozomální RNA. Případně lze eliminovat i určité RNA, které jsou hojně zastoupeny v analyzovaném vzorku (např. hemoglobin ve vzorcích krve) a nejsou primárním cílem experimentu<sup>18</sup>. Globinová RNA tvoří až 76 % mRNA a pokud není před sekvenací odstraněna, významně se sníží detekovatelnost transkriptů s nízkou expresí. Vyselektovaná RNA je pak fragmentována, přepsána do cDNA, na konce molekul jsou připojeny adaptory (obsahují sekvence pro navázání fragmentu na flow-cell sekvenátoru a pro nasedání primerů) s indexy



(pro identifikaci vzorků) a pomocí PCR amplifikována. Takto připravené knihovny jsou pak sekvenovány na přístrojích sekvenování nové generace, které umožňují masivní paralelní sekvenování miliónů krátkých fragmentů najednou. Získané fragmenty jsou pak namapovány na referenční sekvenci. Podle počtu namapovaných readů se kvantifikuje množství jednotlivých transkriptů.

Zatímco microarray se používá už od roku 1995<sup>19</sup>, RNA sekvenování se začalo používat až s rozvojem technologie sekvenování nové generace v roce 2008<sup>16, 20, 21</sup>. Nevýhodou microarray v porovnání s RNA sekvenováním je užší dynamický rozsah, způsobený hybridizací pozadí (neumožní detekci transkriptů s nízkou expresí) a nasycení práb čipu (neumožní kvantifikaci transkriptů s vysokou expresí)<sup>22, 23</sup>. Technologií RNA sekvenování je tedy možné detekovat vyšší počet diferencielně exprimovaných genů. Navíc zvětšením hloubky čtení lze detekovat i transkripty s velmi nízkou expresí. RNA sekvenováním lze také odlišit jednotlivé transkripční varianty. Nevýhodou sekvenování oproti microarray, je velikost získaných souborů a náročnější bioinformatická analýza. Nicméně výsledky diferencielní exprese, získané pomocí microarray a RNA sekvenováním, spolu dobře korelují. Lépe však korelují transkripty s vyšší expresí (>70 %) než ty s expresí nižší (20 – 40 %) <sup>24</sup>. Z hlediska aplikovatelnosti těchto metod pro účely zjišťování rozdílů v expresi mezi různými biotickými nálezy, lze použít jak microarray, tak RNA sekvenování. Pokud hledáme rozdíly mezi velmi podobnými biotickými nálezy, bude vhodnější RNA sekvenování.

### 3.2. VYUŽITÍ MICROARRAY V DIAGNOSTICE LEDVINNÝCH ŠTĚPŮ

---

První studie, která využila metodu microarray, k odlišení akutní a chronické rejeckce ledvinných štěpů u 67 indikačních biopsií, byla provedena v roce 2003<sup>25</sup>. Následovala řada studií, které zjišťovaly molekulární fenotyp různých diagnóz ledvinných štěpů (akutní rejeckce<sup>26, 27</sup>, protilátkami zprostředkovaná rejeckce<sup>9, 28, 29</sup>, C4d-negativní ABMR<sup>30</sup>, T-buňkami zprostředkovaná rejeckce<sup>31, 32</sup>, transplantační glomerulopatie<sup>33</sup>, akomodace u ABO inkompatibilních transplantací<sup>34</sup>, hraničních změn<sup>35, 36</sup>, vaskulární rejeckce<sup>37</sup>, akutní poškození ledvin<sup>38</sup>, toxicita inhibitorů kalcineurinu<sup>39</sup>) nebo se snažily pomocí microarray identifikovat prognostické biomarkery chronického poškození štěpu<sup>40</sup>, selhání štěpu<sup>41, 42</sup>, fibrózu<sup>43</sup>, progresu do rejeckce<sup>44</sup> či zhoršení funkce<sup>36</sup>.

V případě endoteliálních transkriptů u protilátkami zprostředkované rejeckce se molekulární diagnostika stala přímou součástí Banffské klasifikace rejeckčních nálezů<sup>6</sup> (endoteliální transkripty u protilátkami zprostředkované rejeckce). Endoteliální transkripty patří mezi tzv. patogenní transkripty (PBTs, pathogenesis related transcripts), jejichž exprese je významná pro patogenezi ledvinných štěpů. První PBTs byly definovány na základě microarray studií na myších modelech transplantace ledvin (transkripty indukované IFN- $\gamma$  a rejeckční transkripty)<sup>45</sup> nebo studií na buněčných kulturách (transkripty asociované s T, B a NK buňkami)<sup>46, 47</sup>. Na základě PBTs pak byly vyvinuty klasifikátory nejprve pro ABMR a TCMR<sup>9, 31</sup>. Následovaly skóre k predikci akutního poškození parenchymu<sup>38</sup>, fibrózu<sup>48</sup>, a non-

compliance s léčbou<sup>49</sup>. Na základě těchto studií byla vyvinuta technologie molekulárního mikroskopu.

Řada studií se pokoušela identifikovat diskriminační set transkriptů pro akutní rejekci z periferní krve<sup>50-54</sup>. Získané diskriminační sety transkriptů pro rejekci se však neshodovaly. Tato nejednoznačnost výsledků byla patrně způsobena odlišnou metodologií a definicí rejekce. Zatímco první dvě studie k odlišení akutní rejekce využily sety transkriptů, vybraných na základě literatury (17 transkriptů-kSORT; the Kidney Solid Organ Response Test<sup>50</sup> a 20 transkriptů ve studii KALIBRE (Kidney Allograft Immune Biomarkers of Rejection Episodes<sup>51</sup>), další studie využily celogenomový přístup pomocí microarray<sup>52, 54</sup> či RNA sekvenování<sup>53</sup>. Jednotlivé studie se lišily také definicí rejekce. Některé sety byly schopné identifikovat pouze akutní T-buňkami zprostředkovanou rejekci<sup>51</sup> nebo pouze protilátkami zprostředkovanou rejekci<sup>54</sup>, jiné akutní T-buňkami i protilátkami zprostředkovanou rejekci<sup>50</sup> a další subklinickou rejekci<sup>52, 53</sup>. Vzhledem k nekonzistentním výsledkům výše uvedených studií, je pro diagnostiku stále nejlepší volbou transkriptomické vyšetření z bioptického vzorku ledviny.

### 3.2.1. Technologie molekulárního mikroskopu (MMDx)

Metoda molekulárního mikroskopu (MMDx) je založena na analýze transkriptomu pomocí microarray. Hladiny pro více než deset tisíc mRNA ve vyšetřovaném vzorku biopsie jsou porovnány s hladinami v referenčním setu biopsií (>2400 vzorků)<sup>32, 55, 56</sup>. Metodika MMDx využívá pro interpretaci nejmodernější přístupy vytváření algoritmů pomocí machine-learning metod<sup>56</sup>, čímž podstatně zpřesňuje diagnostiku. Výstupem molekulárního vyšetření je klasifikace rejekce na T-buňkami zprostředkovanou<sup>32</sup> či protilátkami zprostředkovanou rejekci<sup>29</sup>, navíc analýza poskytuje i údaj o míře a závažnosti rejekce. Kromě rejekčních změn je posuzováno akutní poškození parenchymu, inflamace nebo ireverzibilní poškození fibrózou. Pomocí molekulárního profilu biopsie je například možné odhalit subklinické poškození štěpu nebo identifikovat pacienty s akutní rejekcí, a to i ve vzorcích bez histologického důkazu zánětu. Další výhodou molekulárního mikroskopu oproti histopatologickému vyšetření je možnost vyhodnotit daleko menší vzorky biopsií (cca 3 mm). Podle současných histologických doporučení vyžaduje standardní hodnocení ledvinných štěpů přítomnost definovaného počtu glomerulů i artérií ve vzorku, zatímco molekulární mikroskop dokáže diagnostikovat rejekci či poškození ledviny i ve vzorcích tvořených pouze dřením ledviny, které nelze jinak hodnotit<sup>57</sup>.

## 3.3. VYUŽITÍ RNA SEKVENOVÁNÍ V DIAGNOSTICE LEDVINNÝCH ŠTĚPŮ

---

Většina dosud publikovaných transkriptomických studií na ledvinných štěpech využila technologii microarray<sup>25-27, 9, 28, 31, 33, 34, 36, 37, 40, 46, 58-61</sup> a jen velmi málo z nich použilo RNA sekvenování<sup>62, 63</sup>. Nicméně v transplantologii bylo RNA sekvenování použito při hledání biomarkerů rejekce<sup>64-67</sup> a vlivu imunosuprese na transkripci genů v periferní krvi<sup>68</sup>. Schopnost detekovat molekulární markery rejekce nezávisle na použité platformě

(microarray versus RNA sekvenování) a v biopsiích ledvin i v periferní krvi potvrdila studie z roku 2017<sup>69</sup>. Nicméně tato studie také ukázala, že počet diferenciálně exprimovaných genů je daleko vyšší v biopsiích než v periferní krvi, a proto transkriptomické vyšetření biopsie je pro diagnostiku mnohem vhodnější.

### 3.4. VYUŽITÍ NANOSTRING TECHNOLOGIE V DIAGNOSTICE LEDVINNÝCH ŠTĚPŮ

---

Další možnost vyšetřování expresního profilu biopsií ledvinných štěpů nabízí nově platforma Nanostring technologie (NanoString nCounter® system)<sup>70</sup>. Princip technologie spočívá v hybridizaci RNA se značenými próbami. Pro každý stanovovaný transkript jsou vytvořeny dvě próby. První, tzv. capture próba, je tvořena 30-50 bázemi komplementárními k danému genu a krátkou sekvencí spojenou s biotinem. Druhá, tzv. reportérová próba, obsahuje 30-50 bazí komplementárních k danému genu plus barevnou značku. Ta je tvořena několika RNA segmenty s fluorescenčními značkami různých barev, přičemž jejich pořadí je specifické pro daný gen. Všechny próby se smíchají s celkovou RNA a dojde k hybridizaci. Navázané komplexy se pak imobilizují pomocí streptavidinu na nosič a detekují se<sup>70</sup>. Výhodou Nanostring oproti MMDx technologii je možnost analyzovat vzorky tkáně fixovaných formalínem a zalitých do parafínu (FFPE vzorky). Tím odpadá nutnost oddělit část vzorku biopsie do prezervační tekutiny RNA lateru k pozdější transkriptomické analýze. U vzorků zalitých do FFPE je vyšší riziko degradace RNA, díky delší době mezi odběrem a zpracováním vzorku. Vzorky se do FFPE ukládají až na oddělení patologie, zatímco do RNA lateru je vzorek vložen ihned po odběru. Nanostring, na rozdíl od MMDx, neumožňuje měření celého genomu, ale pouze vybraného panelu 770 genů. Tyto geny byly vybrány na základě tzv. patogenních transkriptů (PBT, pathogenesis related transcripts), zjištěných technologií MMDx, a jejich klasifikační schopnost pro diagnostiku biopsií z FFPE vzorků nebyla dosud prokázána. Když byla porovnána exprese vybraných 219 genů v 51 vzorcích biopsií, uchovávaných buď v FFPE nebo v RNA lateru, byla celková míra korelace mezi oběma způsoby uchování vzorků vysoká, ale např. u transkriptů asociovaných s ABMR (u 24/74) byla korelace špatná.<sup>71</sup> Jelikož se nejednalo o transkripty s nízkou expresí, je možné, že některé transkripty jsou více náchylné k degradaci způsobené typem uchování vzorku. Recentní analýza, která porovnála výsledky RNA sekvenování a microarray u vzorků biopsií uchovaných v RNA lateru oproti FFPE zjistila, že degradace RNA u FFPE vzorků významně ovlivňuje výsledek diferenciální exprese<sup>72</sup>. Horší výsledky RNA sekvenování u 10 vzorků biopsií ledvin z parafínu v porovnání se zamraženými vzorky potvrdila i další menší studie<sup>73</sup>. Klasifikátor pro T-buňkami zprostředkovanou rejekci, založený na vzorcích v RNA lateru, vykazuje 94% přesnost, zatímco ten založený na vzorcích z FFPE má pouze 73% přesnost. Nanostring panel nebyl dosud validován na dostatečně velkém souboru pacientů, na rozdíl od MMDx technologie, kde referenční set změřených biopsií je větší než 2400. Dosud publikované studie u transplantovaných ledvin měřily jen vybrané malé sety transkriptů, první studie 19 transkriptů u 40 vzorků<sup>74</sup>, druhá 35 transkriptů u 125 FFPE vzorků<sup>75</sup>.

### 3.5. PRINCIP SINGLE-CELL RNA SEKVENOVÁNÍ A MOŽNOSTI VYUŽITÍ V DIAGNOSTICE

---

Dalším novým transkriptomickým nástrojem se stalo tzv. single-cell RNA sekvenování<sup>76</sup> (umožňuje měřit expresi tisíce transkriptů v tisícovkách jednotlivých buněk najednou). Vzhledem k tomu, že ledvina je komplexní orgán, který sestává z funkčně i morfologicky odlišných částí, single-cell RNA sekvenování nám umožní zjistit přímo, které buňky se účastní patologického procesu. Kompartment-specifickou expresi je možné zjistit také pomocí laserové mikrodisekce, kdy je možné izolovat RNA z vyříznutých glomerulů, tubulů či intersticia<sup>77, 78</sup>. Nicméně laserovou mikrodisekcí se získá jen velmi omezené množství RNA, což limituje množství měřených transkriptů a navíc nám neposkytne informaci o typech buněk v jednotlivých kompartmentech. Výhodou single-cell RNA sekvenování z hlediska interpretace bioptických nálezů ledvinných štěpů, je zejména analýza subpopulací lymfocytů a jejich exprese v souvislosti s odhojováním štěpů<sup>79</sup>. Výsledky prvního single-cell RNA sekvenování na třech vzorcích lidské ledviny<sup>80</sup> odhalily existenci nejméně 10 klastřů buněk s odlišnou expresí (3 klastry buněk proximálních tubulů, buňky distálního tubulu, 2 klastry buněk sběrných kanálků, glomerulární buňky a z infiltrujících buněk NK-T buňky, monocyty a B buňky). Jednotlivé klastry buněk byly identifikovány na základě dříve popsanych markerů exprese (jako např. *CD14*, differentiation antigen pro monocyty; *CD79B*, B-Cell Antigen Receptor Complex-Associated Protein Beta pro B lymfocyty; *UMOD*, uromodulin pro distální tubulus). Mezi limitace použití této techniky patří potřeba vysokého množství získaných buněk (přičemž velikost biopsie je pouze cca 10x2 mm) a také zatím neumožňuje zpracování archivního materiálu. Nicméně už vyšla první pilotní práce, kde byl touto metodou úspěšně porovnán jeden vzorek dárce ledviny a jeden vzorek biopsie s protilátkami zprostředkovanou rejekcí<sup>81</sup>. Princip metody spočívá v tom, že nejprve se mechanicky a enzymaticky (trypsin) oddělí z tkáně jednotlivé buňky. Ty se zapouzdří spolu s oligo-dT primery do kapiček v mikrofluidním zařízení, kde probíhá i reverzní transkripce do cDNA. Zároveň se ke všem cDNA z jedné kapičky připojí specifická sekvence označující cDNA odvozenou z jedné buňky. Další příprava knihoven je obdobná jako u klasického RNA sekvenování. Jednotlivé typy buněk jsou potom klastrovány podle podobnosti transkriptomických profilů pomocí mnohorozměrné statistické analýzy. Typy buněk jsou pak stanoveny podle exprese známých markerů v jednotlivých klastrech.

## 4. HRANIČNÍ ZMĚNY LEDVINNÝCH ŠTĚPŮ

---

Incidence nálezu hraničních změn (BL, z angl. borderline changes) se celosvětově pohybuje mezi 11-23%<sup>82,83,84</sup>. V IKEM byl podíl BL v letech 2005 -2019 ze všech biopsií 13 %.

Kategorie BL byla začleněna do Banffské klasifikace v roce 1997<sup>85</sup> a byla definovaná jako tubulitida s intersticiálním zánětem v nejméně 10 % ledvinné kůry (Banff i>0). Během následujících let byla tato kategorie několikrát upravena. V roce 2005 byl do kategorie BL zařazen nález izolované tubulitidy bez intersticiálního zánětu<sup>86</sup>. Při poslední aktualizaci Banffské klasifikace v roce 2019<sup>8</sup> byl ale nález izolované tubulitidy z kategorie BL opět vyřazen. Podkladem pro tuto změnu bylo zjištění, že pětileté přežívání štěpů u pacientů s izolovanou tubulitidou je podobné jako u normálních biopsií bez inflamace a tubulitidy (Banff i0t0)<sup>87</sup>.

Dle výsledků observačních studií zvyšuje nález BL riziko rozvoje následné rejekce i fibrózy, což vede k horšímu přežití štěpů<sup>88</sup>. Proto jsou dnes BL ve většině transplantačních center léčeny pulsy steroidů, stejně jako akutní rejekce. Na druhou stranu nebyla dosud publikována žádná velká randomizovaná studie, která by jasně podpořila oprávněnost léčby u pacientů s BL.

První retrospektivní studie porovnávající vznik akutní rejekce po nálezu BL<sup>82</sup> ukázala, že pouze 18 z 65 (28 %) pacientů s neléčenými BL vyvinulo během následujících 40 dní histologicky prokázanou rejekci. Další retrospektivní studie, která sledovala pacienty s diagnózou BL, léčených steroidy (n=42) s pacienty neléčenými (n=49), nezjistila rozdíl v přežití štěpů ani následné renální funkci<sup>89</sup>. Nejednalo se ale o randomizovanou studii a u pacientů z léčené skupiny byly BL diagnostikovány statisticky významně dříve po transplantaci.

Prognóza po nálezu BL zůstává nejasná, a to zejména kvůli heterogenitě této skupiny. Při posuzování výsledků retrospektivních studií je nutné brát v úvahu několik faktorů. Za prvé je třeba si uvědomit, zda se jedná o nález BL v indikační biopsii, spojený se zhoršením funkce štěpu, nebo nález v biopsii protokolární (kontrolní) při stabilní funkci štěpu, a tedy subklinický. Důležité je také, jestli všichni pacienti s touto diagnózou byli léčeni pulsy steroidů. V IKEM je sice léčeno téměř 90 % pacientů s BL, ale v jiných transplantačních centrech<sup>90</sup> jich je léčeno daleko méně, což může významně ovlivnit výsledky. Některá transplantační centra řeší nález BL pouze navýšením takrolimu u pacientů s nižší hladinou v rozmezí 3-5 ng/ml na 5-7 ng/ml nebo optimalizací dávkování mykofenolátu. Horší přežití štěpů budou také mít pacienti, u nichž se vyskytnou BL zároveň s jiným patologickým nálezem jako například s protilátkami zprostředkovanou rejekcí, trombotickou mikroangiopatií, BKV nefropatií či rekurencí glomerulonefritid. Také je třeba ověřit, jakou Banffskou klasifikaci autoři použili pro definici této kategorie.

Horší jednorochní i pětileté přežití štěpů po nálezu BL (definovanými dle Banff 2019, po vyloučení izolované tubulitidy) v porovnání s normálním nálezem (bez inflamace, rejekce, rekurence GN a BKN) potvrdila australská studie autorů Nankivell a kol.<sup>88</sup> Jednalo se

o poměrně velkou studii, kam bylo zařazeno 146 pacientů s hraničními změnami bez současného výskytu jiných patologií a 826 normálních nálezů. Limitací této studie je vysoký podíl protokolárních biopsií s hraničními změnami (63 %). Interpretaci výsledků také ztěžuje fakt, že pouze 83 % indikačních a 62 % protokolárních BL bylo léčeno. U poměrně vysokého počtu pacientů s BL (39 %) se následně rozvinula rejekce. Horší prognózu měli pacienti s nálezem BL v indikačních biopsiích, u nichž se objevila následná rejekce v 50 % v porovnání s 33% po nálezem BL v protokolárních biopsiích. Překvapivým zjištěním analýzy párových sekvenčních biopsií bylo, že intersticiální zánět přetrvával do 3 měsíce od diagnózy BL u téměř třetiny nálezů (27 % indikačních a 28 % protokolárních BL). Z toho vyplývá, že zlepšení renální funkce po podání antirejekční léčby nemusí zcela reflektovat pokračující subklinickou rejekci.

Další dvě retrospektivní studie se zabývaly osudem ledvinného štěpu po nálezem BL v převážně protokolárních biopsiích ve 3<sup>91</sup> a 6 měsíci po transplantaci<sup>92</sup>. První studie porovnávala 183 nálezů BL a 131 normálních nálezů ve 3. měsíci a druhá studie 102 nálezů BL a 304 normálních nálezů v 6. měsíci. Vyšší riziko následného rozvoje rejekce bylo po nálezem BL ve 3. měsíci (31 %) <sup>91</sup> než v 6. měsíci (8 %) <sup>92</sup>. U obou studií bylo ale toto riziko větší po nálezem BL než po normálním nálezem. Stejně tak incidence *de novo* DSA v následujících 36 měsících u nich byla vyšší než po normálním nálezem v protokolární biopsii. Ani jedna ze studií neprokázala významný rozdíl mezi ISO-T a I+T podskupinami BL v pětiletém přežití štěpů, tvorbě *de novo* DSA ani v progresi intersticiální fibrózy a tubulární atrofie (IFTA) po jednom roce od diagnózy. Přestože kratší doba do dosažení kompozitního endpointu (rejekce a/nebo selhání štěpu) byla zjištěna jak u ISO-T, tak u I+T v porovnání s normálním nálezem<sup>91, 92</sup>, tak riziko dosažení kompozitního endpointu po subklinických BL v 6. měsíci bylo 7x vyšší u I+T (HR=7, p=0,0005) a pouze 3x vyšší u ISO-T (HR=3,15, p=0,02)<sup>92</sup> v porovnání s normálním nálezem. Nález ISO-T v protokolárních biopsiích je tedy zřejmě o něco méně rizikový než I+T.

Prognózou ISO-T v indikačních biopsiích se zabývala studie, do které bylo zařazeno 70 pacientů s ISO-T a 36 s I+T<sup>93</sup>. ISO-T neměla vliv na dosažení kompozitního endpointu (selhání štěpu a/nebo dvojnásobné zhoršení kreatininu) ani v indikačních biopsiích (log rank p= 0,51). Přestože výsledek nedosáhl statistické významnosti, méně pacientů ze skupiny ISO-T (5%) než ze skupiny I+T (14%) dosáhlo kompozitního endpointu, z čehož autoři vyvozují menší rizikovitost této diagnózy. Výhodou této studie je, že autoři zařadili pouze pacienty s diagnózou hraničních změn bez přítomnosti dalších patologií (glomerulonefritida, BKV nefropatie, ABMR). Mezi limitace této studie patří poměrně malý soubor s malým počtem endpointů, dále rozdílné zastoupení počtu léčených pacientů v obou skupinách (16 % ISO-T léčených, 56 % I+T léčených) a také fakt, že ISO-T biopsie byly provedené později (medián 83 dní vs. 7 dní u I+T).

Dosud největší studie, která se zabývala izolovanou tubulitidou<sup>87</sup>, porovnávala 393 biopsií s ISO-T a 254 I+T. Převážná většina biopsií v této studii byla ale protokolárních, přičemž víc jich bylo ve skupině ISO-T (73 %) než v I+T (57 %). U indikačních biopsií mezi hlavní klinicko-patologické diagnózy související s ISO-T patřila akutní tubulární nekróza (37 %) a IFTA (30

%), zatímco protokolárních biopsií to byla převážně IFTA (50 %) či normální nález (39 %). Nicméně analýza hlavních komponent (tzv. principal komponent analýza) histologických Banff skóre ukázala, že i když se ISO-T odděluje od TCMR, neklastuje se dohromady s normálním nálezem. Nejedná se tedy o zcela normální nález, přestože pětileté přežití štěpů ISO-T (92,7 %) se od normálního nálezu nelišilo (98,8 %), zatímco u skupiny I+T bylo horší (81,7 %). Na přežití štěpů se ale podílí řada faktorů, jako například věk dárce, příjemce, retransplantace, hladina panel reaktivních protilátek nebo to, zda biopsie s BL byla léčená a při posuzování vlivu ISO-T na přežití by tedy model měl být na tyto proměnné adjustován. V této studii byly častěji léčeny biopsie s I+T než s ISO-T.

Léčba izolované tubulitidy pomocí steroidů neovlivnila přežití štěpů, ani incidenci následných rejekcí<sup>94</sup>. Nicméně se jedná o retrospektivní studii, kde skupina neléčených nálezů představovala pouze 19 z 90 ISO-T a eliminaci léčby u izolované tubulitidy by mohla potvrdit pouze randomizovaná studie. Při retrospektivním designu studie mohlo být rozhodnutí ISO-T neléčit podloženo diabetem pacienta nebo současně probíhající infekcí.

Současná histopatologická kritéria pro odlišení BL a TCMR jsou nedostatečná pro identifikaci rejekčního fenotypu BL a metoda molekulárního mikroskopu tak nabízí možnost jasně odlišit rejekční a nerejekční molekulární fenotyp. Molekulární fenotypizaci BL pomocí metody molekulárního mikroskopu se zabývalo několik studií, které se shodly na tom, že pouze 30 % BL vykazuje rejekční fenotyp<sup>95,96,35,97</sup>. První microarray studie porovnála pomocí rejekčního klasifikátoru 40 BL, 35 TCMR a 116 biopsií bez rejekce<sup>35</sup>. Pozitivní rejekční skóre mělo 25/35 (71 %) TCMR, 13/40 (33 %) BL a 3/116 (3 %) normálních nálezů. Biopsie s BL s vysokým rejekčním skóre měly vyšší histologické skóre pro fibrózu (ci) a tubulární atrofii (ct), což ztěžuje histologické hodnocení intersticiálního zánětu (i) v nezjizvené tkáni. Při validaci metody molekulárního mikroskopu na souboru 300 biopsií ve studii INTERCOM bylo zahrnuto 46 (15 %) indikačních biopsií s BL, přibližně polovina z nich byla provedena s odstupem více než 1 roku po transplantaci<sup>29,32</sup>. V tomto souboru mělo pozitivní rejekční skóre asi 15 % BL biopsií, přičemž 7/46 BL (15 %) mělo pozitivní ABMR skóre a 8/46 (17 %) TCMR skóre. Mezinárodní validace na větším souboru biopsií<sup>60</sup> (n=1679) zahrnula 128 BL, z nichž 28/128 (22 %) mělo pozitivní ABMR a 16/128 (13 %) pozitivní TCMR skóre.

Většina BL, které byly analyzovány v těchto studiích, byla diagnostikována v indikačních biopsiích nejméně 1 rok po transplantaci. Mnohem progresivnější fenotyp BL v indikačních biopsiích jsme potvrdili v naší microarray studii<sup>36</sup> na souboru 28 pacientů. Vyšší podíl pozitivního rejekčního skóre (geometrický průměr 109 transkriptů asociovaných s rejekcí) u BL v indikační biopsii (38 %) v porovnání s protokolární biopsií (17 %) potvrdila i další studie<sup>98</sup>.

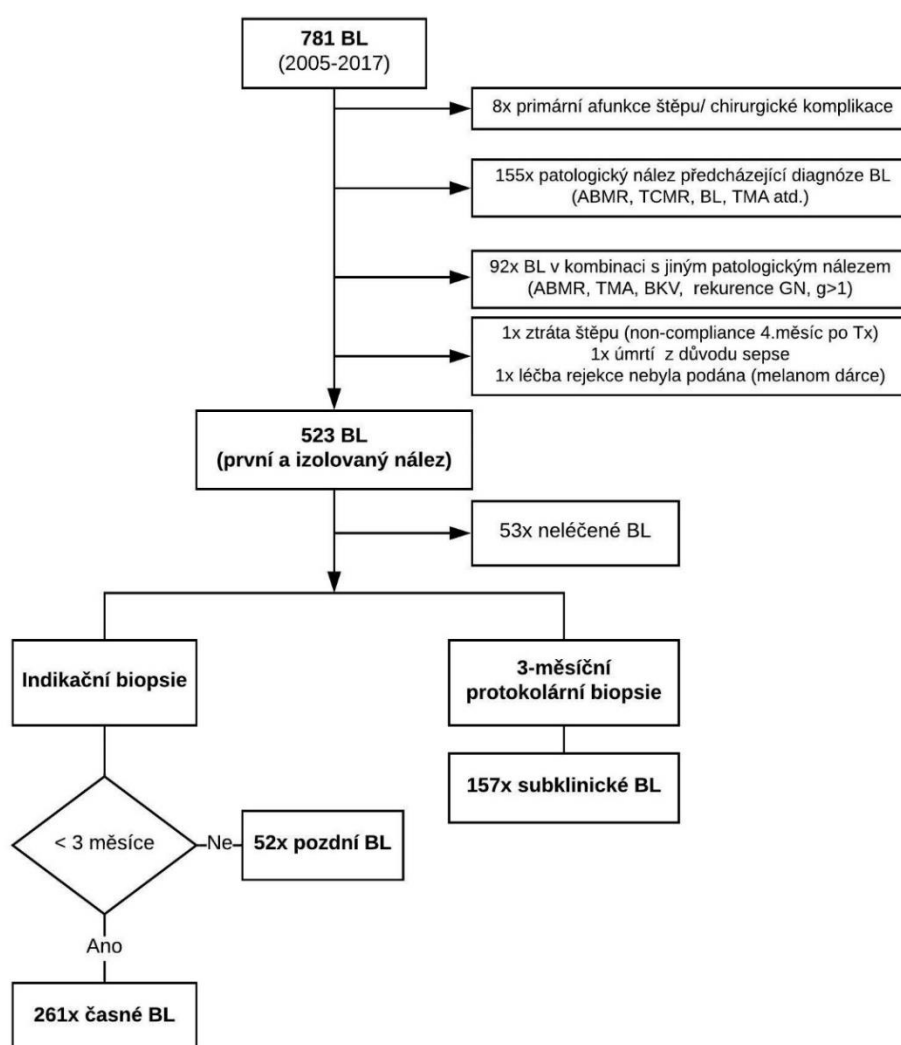
Vzhledem k tomu, že prognóza pacientů po BL je nejasná, zpřesnění diagnózy pomocí transkriptomických nástrojů a vytipování klinických rizikových faktorů, by pomohlo léčbu zacílit pouze na rizikové pacienty.

## 5. KOMENTÁŘ K VLASTNÍM VÝSLEDKŮM

### 5. 1. RIZIKOVÉ FAKTORY SELHÁNÍ ŠTĚPU PO DIAGNÓZE HRANIČNÍCH ZMĚŇ

#### 5.1.1. Opožděná funkce štěpu, starší dárce ledviny a nález hraničních změn v období časně po transplantaci zhoršují 5leté přežití štěpu

Nejprve jsme vyhodnotili klinické rizikové faktory progresivního fenotypu BL. Retrospektivní analýzou pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny v IKEM mezi lednem 2005 až 2017 (n=2771), jsme identifikovali 781 pacientů s nálezem BL. U 523 z nich byly BL diagnostikovány jako první a izolovaná diagnóza (**Obrázek 1**).



**Obrázek 1** Retrospektivní analýza dat pacientů IKEM s diagnózou hraniční změny (BL). Do analýzy byli zařazeni všichni pacienti, u kterých byly hraniční změny diagnostikovány jako první patologický nález a tento nález nebyl přítomen současně s další patologií. U všech zařazených pacientů byly BL léčeny pulsy steroidů.

BL, hraniční změny; ABMR, protilátkami-zprostředkovaná rejekce; TCMR, T-buňkami zprostředkovaná rejekce; TMA, trombotická mikroangiopatie; BKV, BK-nefropatie, GN, glomerulonefritida, g, glomerulitida.



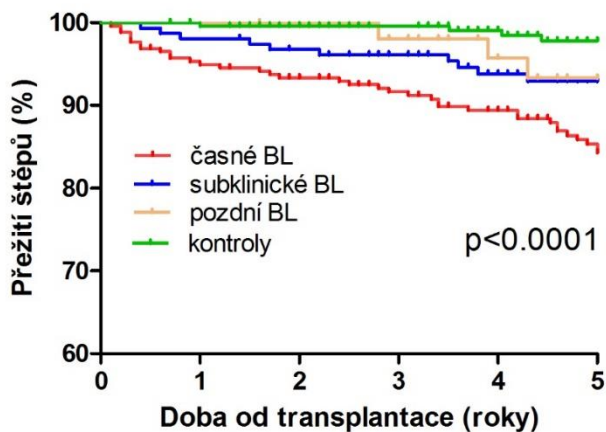
Pouze 53 z 523 (10%) pacientů s BL nebylo léčeno steroidy, a to především kvůli probíhajícímu infekčnímu onemocnění, riziku dekompenzace diabetu nebo subklinickému nálezu. Hraniční změny byly u pacientů po transplantaci ledviny diagnostikovány spolu se zhoršením funkce štěpu v období brzy po transplantaci (n=261, 55,5 %) či v pozdějším období po 3. měsíci po transplantaci (n=52; 11,1 %). Často jsou BL zjištěny jako subklinický nález v protokolární biopsii (n=157; 33,4 %), která se v IKEM provádí standardně všem pacientům ve 3. měsíci po transplantaci. Demografické údaje pacientů zařazených do studie jsou uvedeny v **Tabulce 1**.

**Tabulka 1** Demografická charakteristika pacientů s diagnózou hraničních změn (BL) a pacientů s normálním nálezem (Kontroly) v tříměsíční protokolární biopsii.

	Klinicky indikované biopsie			Protokolární biopsie (3M)		
	Časné BL (n=261)	Pozdní BL (n=52)	p	Subklinické BL (n=157)	Kontroly (n=250)	p
Věk příjemce, roky	50 [19;80]	49 [26;72]	0,432	53 [20;80]	56 [19;81]	0,309
Pohlaví příjemce, mužské, n (%)	196 (75,1%)	34 (65,4%)	0,169	108 (68,8%)	154 (61,6%)	0,167
Retransplantace, n (%)	23 (8,8%)	3 (5,8%)	0,591	21 (13,5%)	31 (12,4%)	0,761
Typ dárce, zemřelý, n (%)	212 (81,2%)	48(94,1%)	<b>0,023</b>	121 (77,1%)	204 (81,6%)	0,31
Věk dárce, roky	52 [4;79]	51 [17;75]	0,363	52 [16;78]	52 [6;76]	0,52
Pohlaví dárce, mužské, n (%)	120 (46%)	29 (56,9%)	0,17	85 (54,1%)	151 (60,6%)	0,216
ECD dárce, n (%)	106 (40,6%)	18 (34,6%)	0,442	62 (39,5%)	111 (44,4%)	0,355
Délka dialýzy, měsíce	20 [0;144]	22 [0;94]	0,441	21 [0;114]	20 [0;130]	0,356
HLA neshoda	3 [0;6]	3 [1;6]	0,889	3 [0;6]	3 [0;6]	0,75
Maximální PRA	4 [0;100]	4 [0;94]	0,499	3 [0;100]	7 [0;99]	0,065
DGF, n (%)	75 (28,7%)	10 (19,2%)	0,176	23 (14,6%)	45 (18,1%)	0,414
Studená ischémie, hod	15 [0;27]	15 [0;24]	0,667	15 [0;31]	13 [0;23]	0,054
<b>Původní onemocnění, n (%)</b>			<b>0,024</b>			0,518
Diabetes	40 (15,3%)	18 (34,6%)		14 (8,9%)	31 (12,4%)	
Hypertenze	24 (9,2%)	3 (5,8%)		12 (7,6%)	28 (11,1%)	
Glomerulonefritida	90 (34,5%)	12 (23,1%)		66 (42%)	91 (36,5%)	
Polycystóza	33 (12,6%)	6 (11,5%)		23 (14,6%)	33 (13,1%)	
Jiné	74 (28,4%)	13 (25%)		42 (26, 8%)	66 (26,4%)	
<b>Indukční léčba</b>			<b>0,004</b>			<b>0,01</b>
Bez indukce	100 (38,5%)	20 (38,5%)		37 (23,6%)	37 (14,9%)	
rATG	59 (22,7%)	22 (42,3%)		68 (43,3%)	144 (58,1%)	
Basiliximab	101 (38,8%)	10 (19,2%)		52 (33,1%)	67 (26,7%)	
Kreatinin při biopsii (μmol/L)	236 [75;926]	188 [101;305]	<b>&lt;0,001</b>	133 [54;354]	126 [64;299]	<b>0,003</b>
Doba od transplantace do biopsie (dny)	9 [4;60]	362 [126;4642]	<b>&lt;0,001</b>	94 [62;124]	94 [69;136]	0,94

Data jsou prezentována jako medián [min;max] nebo počty (%). <sup>a</sup>DGF (opožděná funkce štěpu) je definována jako potřeba dialýzy v prvním týdnu po transplantaci.

Pětileté přežití štěpů (**Obrázek 2**) bylo nejhorší u pacientů s BL v časné indikační biopsii (84,3 %) v porovnání s 92,9 % u subklinických BL; 93,2 % u pozdních BL a 97,8 % u kontrol s normálním nálezem v protokolární biopsii.



Počet subjektů v riziku	časné BL (<3M)	subklinické BL (3M)	pozdní BL (>3M)	kontroly (3M)
0	61	157	52	250
1	242	153	52	248
2	230	149	52	226
3	211	137	50	201
4	189	112	41	177
5	163	94	35	126

**Obrázek 2.** Kaplanův-Meierův odhad přežití štěpů cenzorovaný na úmrtí: časné BL vs. kontroly,  $p < 0,001$ ; subklinické BL vs. kontroly,  $p = 0,0136$ ; pozdní BL vs. kontroly,  $p = 0,1136$ ; časné BL vs. subklinické BL,  $p = 0,0209$ ; časné BL vs. pozdní BL,  $p = 0,0977$ .

Abychom zjistili klinické faktory, které ovlivňují 5leté přežití štěpu po diagnóze BL, provedli jsme multivariantní analýzu na kohortě 470 pacientů s BL. Do analýzy byli zařazeni pouze pacienti, u nichž byly hraniční změny léčeny pulsy steroidů, abychom eliminovali možný efekt léčby. V multivariantní Coxově regresi adjustované na marginálního dárce a délku dialýzy, bylo riziko selhání štěpu vyšší u pacientů s opožděnou funkcí štěpu (HR=2,77, 95% CI: 1,57-4,91,  $p < 0,001$ ), vyšším věkem dárce (HR=1,04, 95% CI: 1,01-1,07,  $p = 0,014$ ) a kratší dobou do diagnózy BL (HR=2,25, 95% CI: 1,17-4,32,  $p = 0,015$ ). Tyto rizikové faktory zůstaly statisticky významné i po adjustaci modelu na indukční léčbu Thymoglobulinem (**Tabulka 2**).

**Tabulka 2** Odhad rizika 5letého přežívání štěpů (cenzorovaného na úmrtí) pro nezávislé rizikové faktory adjustované na **A.** marginálního dárce a délku dialýzy a **B.** marginálního dárce, délku dialýzy a indukci Thymoglobulinem.

	Multivariantní analýza <sup>A</sup>			Multivariantní analýza <sup>B</sup>		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Opožděná funkce štěpu	2,77	1,56-4,91	<0,001	2,57	1,44-4,59	0,001
Věk dárce (roky)	1,04	1,01-1,07	0,014	1,04	1,01-1,07	0,011
Časná diagnóza hraničních změn	2,25	1,17-4,32	0,015	2,39	1,21-4,70	0,012

U pacientů s časnými BL dochází častěji k progresi do akutní T-buňkami zprostředkované rejekce (20,3 % vs. 3,8 % u pozdních BL a 5,1 % u subklinických BL,  $p < 0,0001$ ) (**Tabulka 3**). Riziko rozvoje TCMR je 5x vyšší, pokud je BL diagnostikována v období časně po transplantaci v porovnání se subklinickým nálezem ve 3. měsíci nebo nálezem v indikační biopsii po 3. měsíci (OR=5,1; 95% CI: 2,5-10,7;  $p < 0,0001$  vs. subklinické BL, OR=4,9; 95% CI: 1,5-16,1,  $p < 0,004$ , vs. pozdní BL).

**Tabulka 3** Výskyt rejekcí (TCMR, T-buňkami zprostředkovaná rejekce; ABMR, protilátkami zprostředkovaná rejekce) a renální funkce (eGFR) po diagnóze hraničních změn.

	Klinicky indikované biopsie		Protokolární biopsie (3M)		P
	Časné BL (n=261)	Pozdní BL (n=52)	Subklinické BL (n=157)	Kontroly (n=250)	
Akutní TCMR, n (%)	53 (20.3%)	2 (3.8%)	8 (5.1%)	6 (2.4%)	<0.0001
Chronická TCMR, n (%)	8 (3.1%)	2 (3.8%)	4 (2.5%)	0	0.047
Akutní ABMR, n (%)	2 (0.8%)	0	1 (0.6%)	0	0.529
Chronická ABMR, n (%)	23 (8.8%)	7 (12.1%)	19 (13.5%)	7 (2.8%)	0.001
<b>eGFR (ml/s):</b>					
při biopsii	0.43 [0.08;1.9]	0.55 [0.29;1.34]	0.83 [0.25;1.49]	0.88 [0.23;2.01]	<0.0001#
3 měsíce po biopsii	0.72 [0.12;1.7]	0.62 [0.30;1.26]	0.85 [0.17;1.61]	0.91 [0.19;2.41]	<0.0001#

### 5.1.2. Biomarkery zhoršení renální funkce po diagnóze hraničních změn

*Hrubá P, Brabcova I, Gueler F, Krejčík Z, Stranecký V, Svobodová E, Malusková J, Gwinner W, Honsová E, Lodererová A, Oberbauer R, Zachoval R, Víklík O. Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. Kidney international. 2015, 88(4), 785-795. IF 7,683.*

Analýzou transkriptomu biopsií s BL pomocí microarray jsme potvrdili vyšší aktivaci imunitních a zánětlivých transkriptů u časných BL v porovnání se subklinickými BL (Tab. 4). To je v souladu s výše uvedenou analýzou klinických dat.

**Tabulka 4** GO termíny aktivované v časných BL v porovnání s tříměsíčními protokolárními biopsiemi.

Transkripty s vyšší expresí v časných BL (n=200, FC>2, FDR < 0,05) v porovnání s tříměsíčními BL byly analyzovány pomocí online nástroje DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>)<sup>99</sup>. V tabulce jsou uvedeny pouze GO termíny s p<0,001.

	GO termín	Počet transkriptů	P (Benjamini)
GO:0009611	Response to wounding	23	9,40E-07
GO: 0009605	Response to external stimulus	30	1,10E-06
GO:0002376	Immune system process	28	5,70E-06
GO:0006954	Inflammatory response	17	3,50E-05
GO: 0050817	Coagulation	9	2,10E-04
GO:0050878	Regulation of body fluid levels	10	2,30E-04
GO: 0050900	Leukocyte migration	7	3,40E-04
GO: 0006935	Chemotaxis	11	4,60E-04

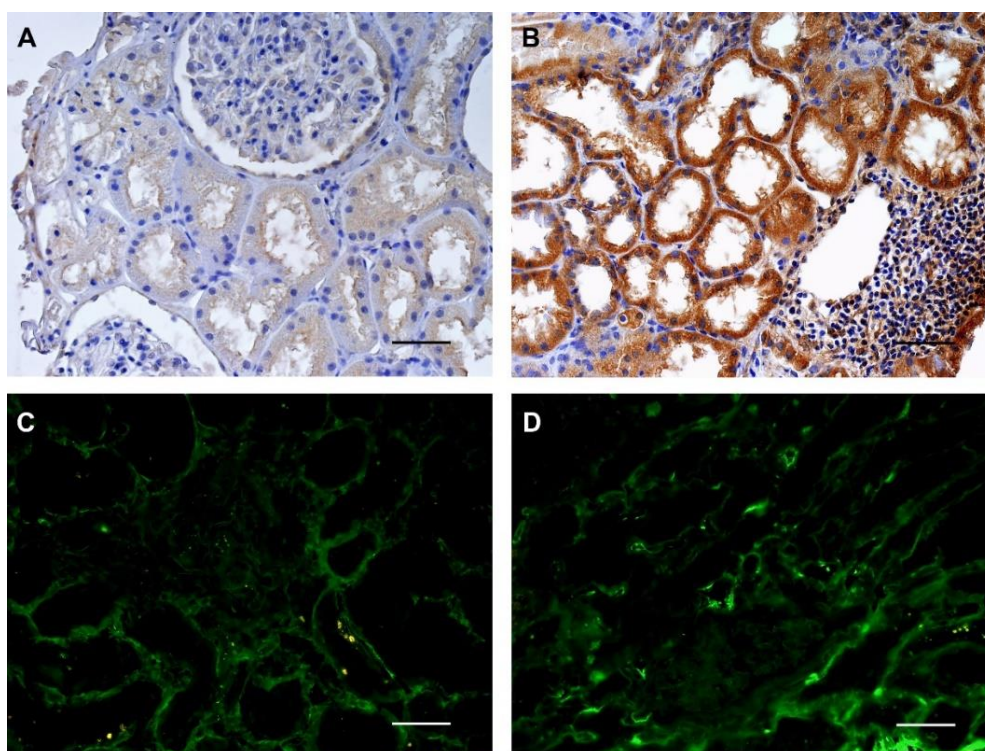
**Tabulka 5** Prediktivní markery zhoršení funkce štěpu po diagnóze časných a subklinických BL.

	Univariální analýza	Multivariální analýza				
	p	B	SE	p	OR	95% CI
<b>Časné BL</b>						
Věk dárce	0,013	0,79	0,035	<b>0,025</b>	1,08	1,01-1,16
<i>CLEC5A</i>	0,022	0,74	0,371	<b>0,046</b>	2,09	1,01-4,33
<i>FGA</i>	0,028			0,477		
<i>SAA1</i>	0,033			0,361		
<b>Subklinické BL</b>						
Panel reaktivní protilátky	0,014			0,161		
<i>FGA</i>	0,017			0,793		
<i>CCL11</i>	0,009			0,837		
<i>FGG</i>	0,011	2,88	1,441	<b>0,046</b>	17,8	1,06-299,7

*CLEC5A*, makrofágový receptor; *FGA*, alfa-fibrinogen; *SAA1*, sérový amyloid; *FGG*-gama fibrinogen, *CCL11*, chemokin CCL11; OR, poměr šancí; 95 % CI; 95 % interval spolehlivosti, SE, standardní chyba.

Vzhledem k tomu, že transkriptomický profil časných BL se liší od subklinického nálezu v protokolární biopsii, potenciální biomarkery zhoršení funkce po této diagnóze jsme analyzovali pro každou skupinu zvlášť. Zhoršení funkce bylo definováno jako nárůst kreatininu o více než 25 % mezi 3 měsícem a 2 lety po transplantaci. Transkripty se zvýšou

expresí u progresorů jsme vybrali na základě celogenomového skreeningu pomocí microarray a jejich expresi jsme validovali pomocí RT-qPCR na jiné kohortě pacientů. Pomocí univariantského modelu binární logistické regrese jsme vybrali proměnné, které signifikantně zvyšovaly riziko zhoršení renální funkce a jejich význam jsme potvrdili multivariantsní analýzou. U časných BL se na zhoršení renální funkce podílí vyšší věk dárce (OR=1,08,  $p=0,025$ ) a vyšší exprese makrofágového receptoru *CLEC5A* v době diagnózy (OR=2,09,  $p=0,046$ ). U subklinických BL multivariantsní analýza potvrdila jako významný faktor progresu pouze vyšší expresi fibrinogenu *FGG* (OR=17,6,  $p=0,046$ ; **Tabulka 5**). Vyšší exprese transkriptů *CLEC5A* a *FGA* v biopsiích BL byla potvrzena i na úrovni proteinů (**Obrázek 3**).



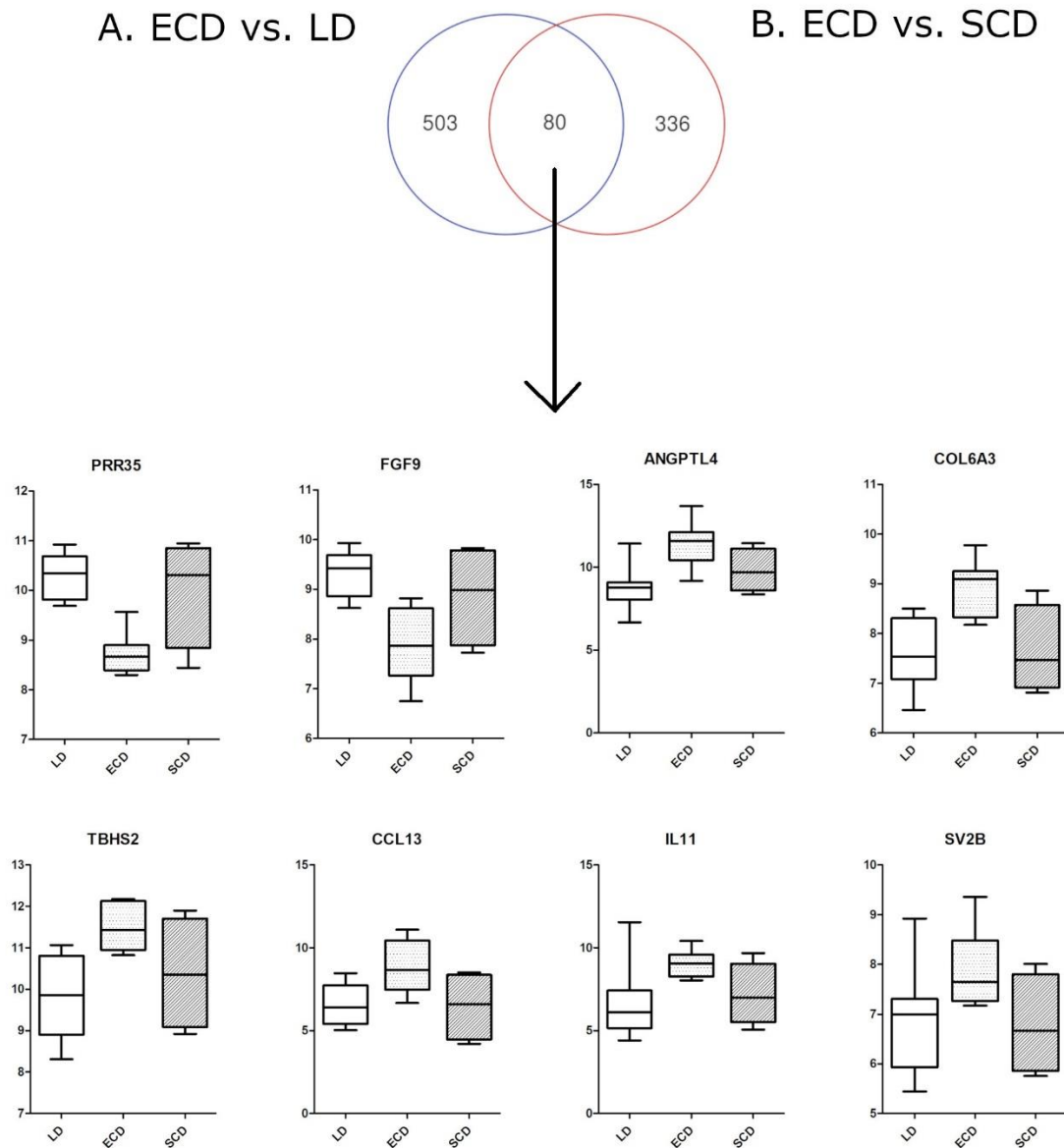
**Obrázek 3** Imunohistochemický průkaz CLEC5A v časných BL a imunofluorescenční průkaz fibrinogenu v subklinických BL neprogresorů (A,C) a progresorů (B,D). Měřítka = 50 $\mu$ m.

### 5.1.3. Vliv věku/typu dárce na expresní profil biopsií s časnými hraničními změnami.

*Hruba 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. 2020, 11(March), art. no. 423. IF 7.561.*

Jelikož ledviny od marginálních a starších dárců vykazovaly horší přežití štěpů u pacientů s diagnózou BL, zaměřili jsme se na porovnání expresních profilů biopsií s nálezem BL, kteří dostali ledvinu od žijících dárců (LD) nebo od kadaverózních dárců se standardními kritérii (SCD) či marginálních dárců (ECD), pomocí microarray analýzy (n=21).

Pro analýzu byli vybráni pouze pacienti s časnými BL, kteří nedostali indukční léčbu Thymoglobulinem. Tím jsme eliminovali efekt doby od transplantace a indukční léčby na genovou expresi. Genová anotační analýza prokázala vyšší expresi transkriptů asociovaných s komplementem a koagulační kaskádou, extracelulární matrix, cytokiny a zánětlivou odpovědí v biopsiích štěpů od ECD dárců.



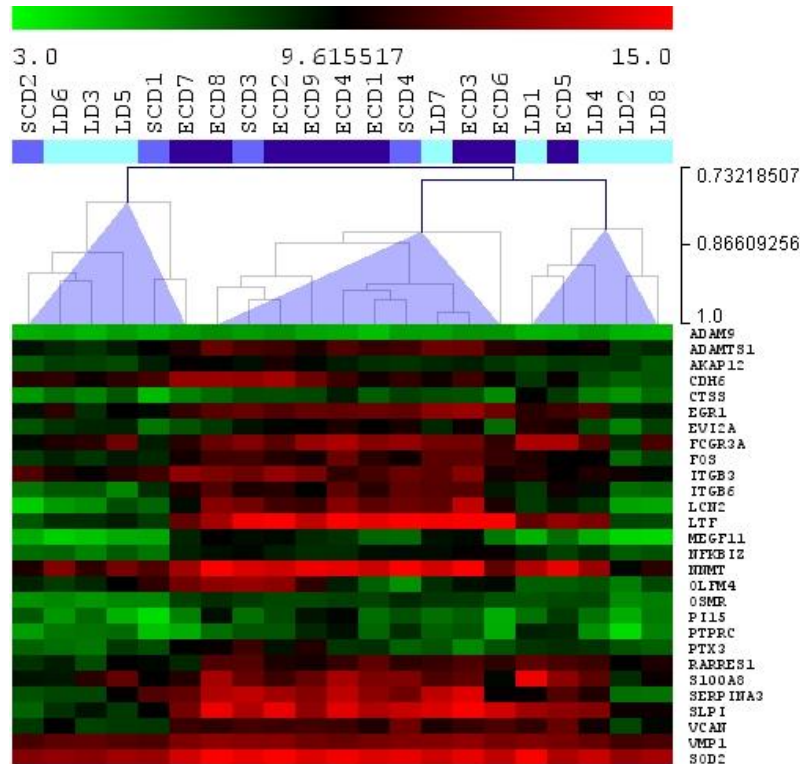
**Obrázek 4** Vennův diagram zobrazující průnik diferenciálně exprimovaných genů mezi časnými biopsiemi s hraničními změnami pro jednotlivá porovnání kategorií dárců ledviny: (A) ECD vs. LD, (B) ECD vs. SCD.

PRR35 – proline-rich 35 protein; FGF9 – fibroblast growth factor 9; ANGPTL4 – angiopoietin-like 4; COL6A3 – collagen, type VI, alpha 3; TBHS2 – thrombospondin 2; CCL13 – chemokine (C-C motif) ligand 13; IL11 – interleukin 11; SV2B – synaptic vesicle glycoprotein 2B.

U ECD dárců byla významně zvýšená exprese transkriptů akutního poškození (AKI transkripty, **Obrázek 5**). Exprese tří z 19 AKI transkriptů byla dokonce více než 10x vyšší

u ECD v porovnání s LD (*LTF*, laktotransferin; *LCN2*, lipocalin and *SERPINA3*, inhibitor serpin peptidázy).

Fibróza a chronické změny již přítomné v ledvinných štěpech marginálních dárců tak mohou být dále zhoršovány alloimunitní odpovědí. Tyto výsledky tedy dále podporují používání depleční indukční léčby Thymoglobulinem u příjemců štěpů od marginálních dárců.



**Obrázek 5** Hierarchické klastrování 28 AKI (akutní poškození) transkriptů u časných indikačních biopsií s hraničními změnami u různých kategorií dárců ledviny. LD, žijící dárce (světle modrá), SCD, kadaverózní dárce (standardní kritéria, středně modrá), ECD (marginální dárce, tmavě modrá). Většina transkriptů akutního poškození byla zvýšená u klastru 2, který je z 70% tvořen marginálními dárci.

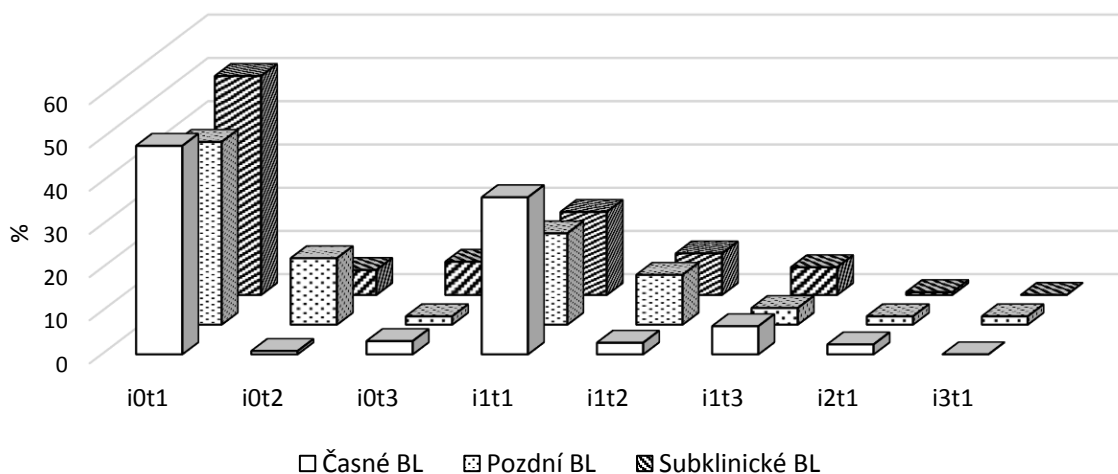
#### 5.1.4. Vliv intersticiálního zánětu na progresivní fenotyp hraničních změn

*Hruha P, Madill-Thomsen K, Mackova M, Klema J, Maluskova J, Voska L, Parikova A, Slatinska J, Halloran P, Viklicky 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. IF 4,379.*

V další části projektu jsme se zabývali podskupinou BL, tzv. izolovanou tubulitidou (ISO-T), která byla v roce 2019 vyloučena z Banffské kategorie hraničních změn<sup>100</sup>. Snažili jsme se zjistit, zda expresní profil izolované tubulitidy opravdu představuje méně rizikový fenotyp. V letech 2005 -2019 zahrnovala Banffská klasifikace<sup>86</sup> hraničních změn 8 kombinací skóre

pro intersticiální zánět (i) a tubulitidu (t). Kromě tubulitidy v kombinaci s intersticiálním zánětem (I+T; i1t1, i1t2, i1t3, i2t1, i3t1) tam patřila také izolovaná tubulitida (i0t1 i0t2 i0t3).

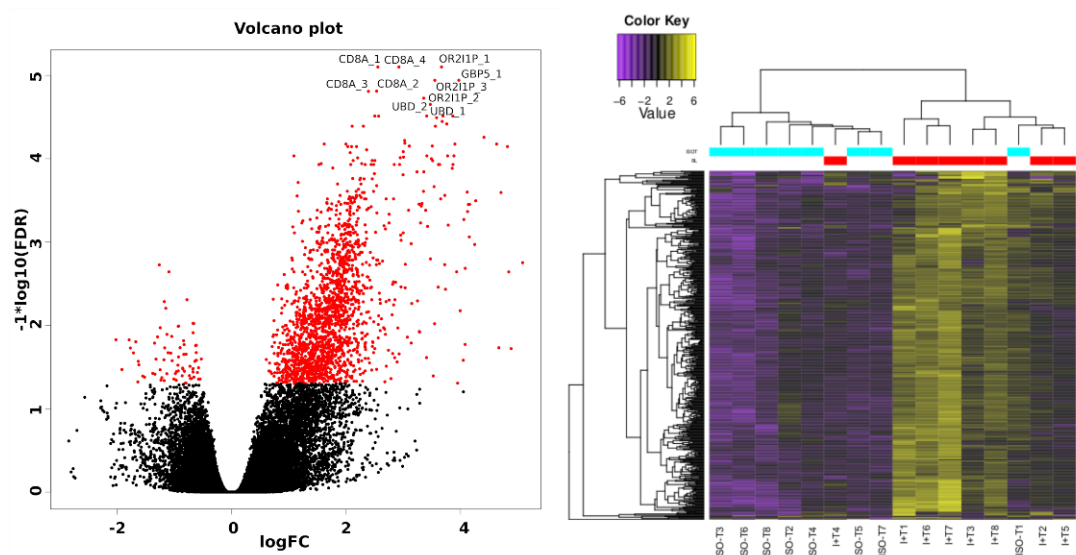
V našem souboru BL (n=470) izolovaná tubulitida představovala 56 % všech biopsií (136 (52 %) u skupiny časných BL, 31 (59,6 %) u pozdních BL and 100 (63,6 %) u subklinických BL (Obrázek 6).



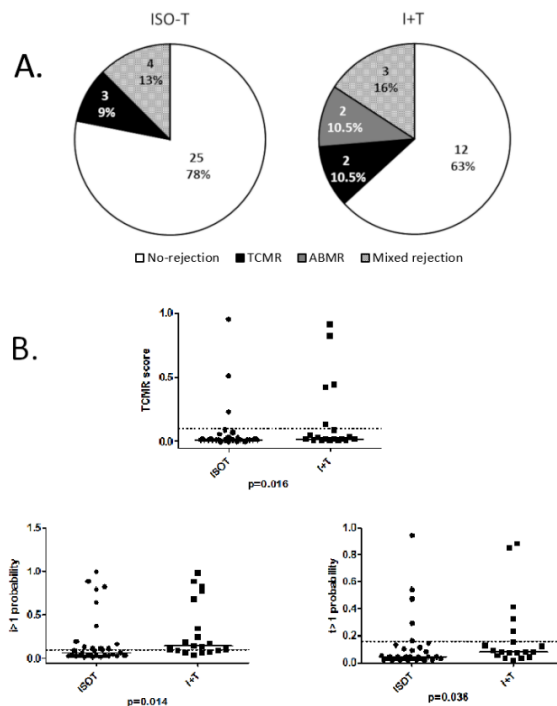
**Obrázek 6** Procentuální podíl jednotlivých kombinací Banff skóre pro tubulitidu (t) a intersticiální zánět (i) v kategorii hraničních změn (n=470).

Porovnali jsme molekulární fenotyp ISO-T (Banff i0t>0) a I+T (Banff i1t>0 or i>1t1) pomocí RNA sekvenování (n=16, **Obrázek 7**). Biopsie s ISO-T měly nižší expresi transkriptů asociovaných s interferon- $\gamma$  ( $p=1,5 \cdot 10^{-16}$ ), cytokinovou signalizací ( $p=2,1 \cdot 10^{-20}$ ) a zánětlivou odpovědí ( $p=1,0 \cdot 10^{-13}$ ) v porovnání s I+T biopsiemi. Odlišný molekulární fenotyp kategorie ISO-T byl validován na zcela jiné kohortě pacientů (19 I+T vs. 32 ISO-T) pomocí metody molekulárního mikroskopu ve spolupráci s profesorem Halloranem z Edmontonu. ISO-T kategorie měla nižší TCMR skóre ( $p=0,016$ ) a vyšší pravděpodobnost intersticiálního zánětu ( $i>1$ ) a tubulitidy ( $t>1$ ),  $p=0,014$  a  $0,036$ . Přesto u 3/32 pacientů s ISO-T bylo pozitivní TCMR skóre a u 4/32 pozitivní ABMR skóre (**Obrázek 8**). Oběma metodami jsme potvrdili, že izolovaná tubulitida má nižší expresi transkriptů asociovaných se zánětem.





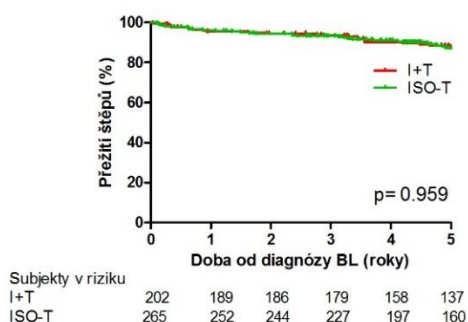
**Obrázek 7** Rozdílně exprimované transkripty mezi biopsiemi s izolovanou tubulitidou (ISO-T) a tubulitidou s intersticiálním zánětem (I+T) zobrazené A. pomocí Volcano plotu (transkripty s FC (fold change) >4 a adjustovaným  $p < 0,05$  jsou zobrazeny červeně) B. pomocí heatmapy, kde je vidět, že vzorek ISO-T1 má podobný expresní profil jako I+T (u této pacientky se následně rozvinula T-buňkami zprostředkovaná rejekce).



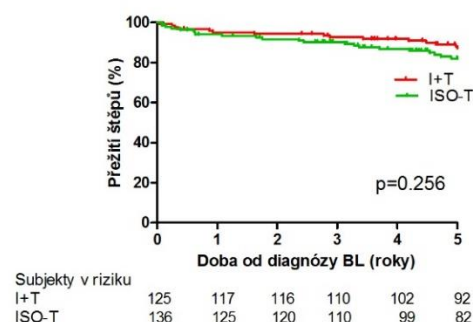
**Obrázek 8** Hodnocení molekulárního fenotypu časných indikačních biopsií s ISO-T (n=32) a I+T (n=19) metodou molekulárního mikroskopu (MMDx). A/ Frekvence jednotlivých MMDx rejekčních diagnóz; B/ MMDx TCMR skóre a skóre tubulitidy ( $t > 1$ ) či intersticiálního zánětu ( $i > 1$ ).

Méně zánětlivý molekulární fenotyp ISO-T odpovídá histologickému nálezu, nicméně i u ISO-T molekulární mikroskop diagnostikoval v 7/32 případech molekulární rejekci. V naší kohortě 470 pacientů s BL jsme se tedy zaměřili na porovnání přežití štěpů mezi podskupinami ISO-T a I+T. Přežití štěpů u pacientů bylo v obou skupinách stejné (86,9 vs. 87,2 %, log rank  $p=0,959$ ) (**Obrázek 9A**), a to i při analýze v podskupinách časných, pozdních a subklinických BL (log-rank,  $p=0,256$ ;  $0,888$  a  $0,188$ ) (**Obrázek 9B, C, D**). Přežití štěpů zůstalo stejné i v multivariantním Coxově regresním modelu ( $p=0,470$ ), adjustovaném na nejvýznamnější rizikové faktory z univariantního modelu (opožděná funkce štěpu, věk dárce, délka dialýzy a chronické změny v biopsii, **Tabulka 6**). Intersticiální zánět tedy zřejmě z hlediska středně dlouhého přežití štěpů není tak významný, zejména pokud se jedná o tak heterogenní skupinu jako hraniční změny a pokud všichni pacienti byli léčeni steroidy.

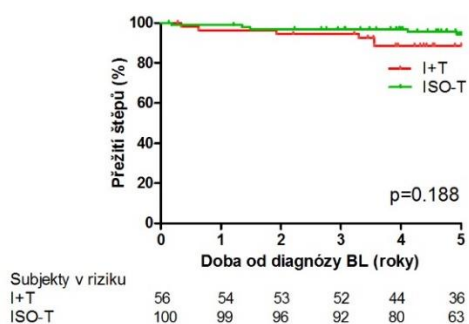
### A. Všechny BL



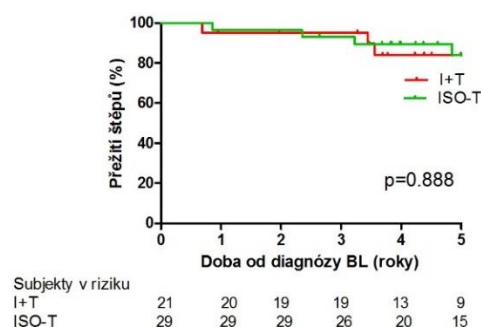
### B. Časné BL



### C. Subklinické BL



### D. Pozdní BL



**Obrázek 9** Kaplanův-Meierův odhad přežití štěpů (censorované na úmrtí) u izolované tubulitidy (ISO-T) a tubulitidy s intersticiálním zánětem (I+T) v celé kohortě hraničních změn (A) a v podskupinách časných (B), subklinických (C) a pozdních BL (D).

**Tabulka 6** Pětileté přežití štěpů u podskupiny ISO-T je stejné jako u I+T i po adjustaci na nejvýznamnější proměnné z univariálního modelu ( $p < 0.1$ ). HR, poměr rizik; 95% CI, 95% interval spolehlivosti.

Multivariální Coxův regresní model	p	HR	95% CI
ISO-T	0,47	0,81	0,46-1,43
Opožděná funkce štěpu	0,001	2,55	1,47-4,42
Věk dárce, roky	0,023	1,03	1,00-1,05
Délka dialýza, měsíce	0,225	1,01	1,00-1,02
Banff skóre pro intersticiální fibrózu (ci)	0,279	1,28	0,82-2,02
Banff skóre pro fibrointimální ztlustění (cv)	0,179	1,28	0,89-1,82
Banff skóre pro arteriolární hyalinózu (ah)	0,884	1,03	0,71-1,50

### 5.1.5. Identifikace progresivního fenotypu časných hraničních změn

*Hruha P, Madiill-Thomsen K, Mackova M, Maluskova J, Voska L, Slatinska J, Halloran PF, Viklicky O. Three-months course of intragraft transcriptional changes in kidney allografts with early histological minimal injury. Transplant international. 2021, 34(5), 974-985. IF 3,782.*

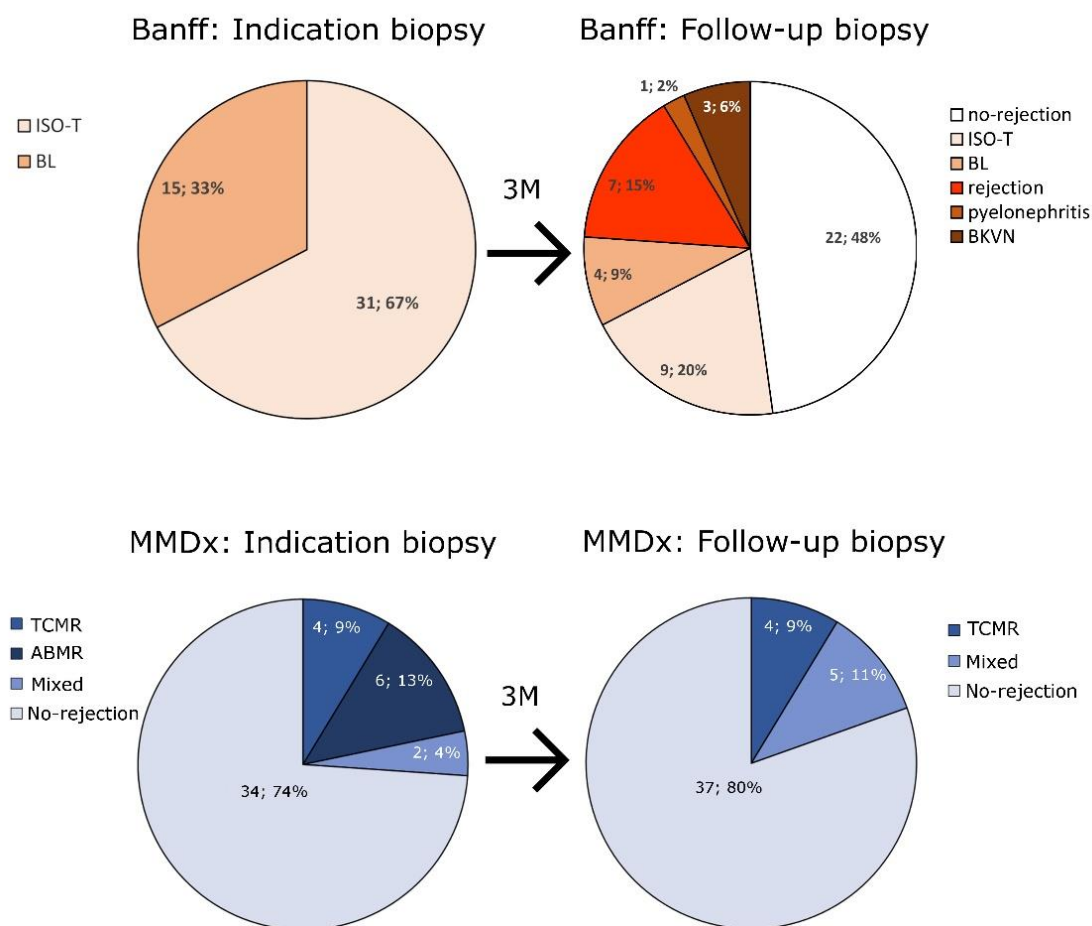
U podskupiny pacientů (11 progresorů a 11 neprogresorů) jsme provedli microarray analýzu (SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K; Agilent) s cílem identifikovat možné biomarkery progresu do TCMR. Po adjustaci výsledků diferenciální exprese na multiplicitní testování nebyl ale zjištěn mezi skupinami žádný statisticky významný rozdíl. Nicméně pokud jsme vzali v úvahu diferenciálně exprimované geny s nejméně dvojnásobným rozdílem exprese a s neadjustovanou  $p < 0,05$ , 366 genů mělo vyšší expresi u progresorů. Genová anotační analýza prokázala u pacientů s BL, kteří rozvinuli následně TCMR, vyšší expresi transkriptů asociovaných s imunitními a zánětlivými procesy. Výsledky microarray byly validovány na větší kohortě pacientů s časnými BL ( $n=43$ ) metodou RT-qPCR. Validace potvrdila pouze vyšší expresi *CXCL2* (macrophage inflammatory protein) u pacientů s časnými BL, u nichž se rozvine TCMR ( $p=0,01$ ). Skupina časných hraničních změn představuje zřejmě velmi heterogenní skupinu nálezů a je těžké najít jasný biomarker progresu.

Proto jsme na další kohortě pacientů provedli transkriptomické vyšetření biopsií s BL pomocí standardizované metody molekulárního mikroskopu na zahraničním pracovišti Alberta Transplant Applied Genomics Centre profesora P. Hallorana. Tato analýza nám umožnila porovnání našich vzorků s transkriptomickým profilem více než 1200 biopsií, analyzovaných v Edmontonu a výrazně zlepšila robustnost našich výsledků. Do Edmontonu bylo odesláno 46 vzorků biopsií s časnými BL (medián 13 dní po transplantaci) a následně protokolární biopsie s cílem zjistit přirozený průběh onemocnění BL na molekulární úrovni.

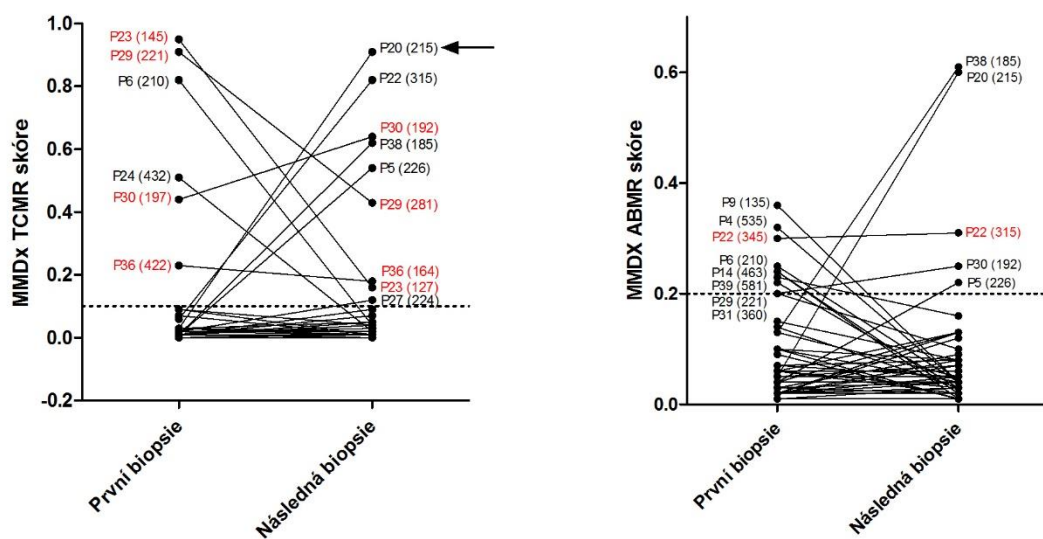
Indikační biopsie, histologicky diagnostikované dle Banffu jako BL byly pomocí MMDx interpretovány v 74 % případech jako nerejekční nález, v 9 % jako TCMR, v 13 % jako ABMR,

a v 4 % jako rejekce smíšená (**Obrázek 10**). Protokolární biopsie ve 3 měsíci byly interpretovány MMDx v 80 % jako nerejekční nález, v 9 % jako TCMR a v 11 % jako smíšená rejekce. V porovnání s indikační biopsií došlo v tříměsíčních biopsiích k poklesu AKI (akutní poškození) ( $p=0,0011$ ) a nárůstu atrophy-fibrosis skóre ( $p=0,0015$ ). Nedošlo však k poklesu ani TCMR ( $p=0,549$ ) ani ABMR rejekčních skóre ( $p=0,805$ ).

MMDx vyšetření indikačních biopsií s histologickým nálezem BL, ukázalo, že asi 26 % má rejekční fenotyp, který u některých pacientů přetrvává do 3 měsíce (u 5 z 12), i když všichni pacienti jsou léčeni steroidy (**Obrázek 11**). Nicméně u 30/46 pacientů (65 %), bylo MMDx rejekční skóre negativní v první biopsii a zůstalo negativní i v následné biopsii. Nejvýznamnějším prediktorem molekulární rejekce ve 3. měsíci bylo vyšší MMDx skóre pro tubulitidu v indikační biopsii ( $AUC=0,84$ ;  $p=0,002$ ), což se potvrdilo i v multivariátní regresi ( $OR=16$ ;  $p=0,016$ ).



**Obrázek 10** Výsledky histologie (Banff) a molekulárního mikroskopu (MMDx) pro časné indikační biopsie s hraničními změnami a jejich odpovídající tříměsíční protokolární biopsie.



**Obrázek 11** Vývoj TCMR a ABMR molekulárního (MMDx) skóre od první indikační biopsie s histologickou diagnózou hraničních změn do následné tříměsíční protokolární biopsie. Pacienti s molekulárním skóre vyšším než cut-off pro daný typ rejekce (přerušovaná čára) jsou označeni číslem a v závorce je uvedena hodnota kreatininu v době biopsie ( $\mu\text{mol/l}$ ).

TCMR, T-buňkami zprostředkovaná rejekce; ABMR, protilátkami zprostředkovaná rejekce. Šipkou je označena pacientka, která nedodržela předepsanou imunosupresivní léčbu. Červeně jsou vyznačeni pacienti s pozitivním MMDx rejekčním skóre v obou biopsiích.

## 5.2. PATOFYZIOLOGIE AKOMODACE U ABO INKOMPATIBILNÍCH TRANSPLANTACÍ LEDVIN

Hruha P., Krejčík Z., Stranecký V, Malusková J, Slatinská J, Gueler F, Gwinner W, Brasen J, Wohlfahrtová M, Paríková A, Osicková K, Froněk 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. IF 4,546.

Analýzu transkriptomu ledvinného štěpu jsme využili také ke studii patofyziologie tzv. akomodace. Akomodace se objevuje u pacientů po transplantaci inkompatibilní ledviny v krevní skupině. ABO inkompatibilní transplantace ledvin jsou v IKEM prováděny od roku 2011<sup>101</sup>, protilátky proti krevní skupině dárce jsou z krve příjemce odstraněny desenzitizací před samotnou transplantací (Rituximab, intravenózní imunoglobuliny a imunoabsorbce)<sup>102</sup>. Výsledky těchto transplantací jsou srovnatelné s transplantacemi

kompatibilními v krevní skupině<sup>103</sup>, a v současnosti představují možnost jak zvýšit dostupnost transplantační léčby. Přítomnost malého množství hemaglutininů v periferní krvi vede k jejich vazbě na endotel a aktivaci komplementu, což se histologicky projevuje jako C4d pozitivita v tříměsíčních protokolárních biopsiích (až u 75 % pacientů<sup>104</sup>). To však nevede ke zhoršování funkce štěpu, a proto se tento histologický fenomén nazývá akomodací. V naší studii jsme porovnali transkriptom C4d-pozitivních biopsií u pacientů po ABO inkompatibilní transplantaci s C4d-pozitivními biopsiemi v případě HLA inkompatibilních pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny a měli přítomny dárcovsky specifické protilátky (DSA). V tomto případě pak pozitivita C4d barvení svědčí pro přítomnost protilátkami zprostředkované rejekce, v případě normální renální funkce pak její subklinické formy. Jako kontrolní skupinu jsme použili C4d negativní biopsie s jinak normálním nálezem. Pomocí microarray analýzy a následné validace metodou RT-qPCR na větší kohortě pacientů jsme zjistili vyšší expresi několika epiteliálních transportérů a metalotioneinů u biopsií se znaky subklinické protilátkami zprostředkované rejekce v porovnání s biopsiemi od pacientů po ABOi transplantaci ledviny<sup>34</sup>. Rovněž jsme u ABO inkompatibilních transplantací pozorovali zvýšenou expresi některých regulačních proteinů komplementu (*CD46* a *CD59*), u HLA inkompatibilních byla zvýšená exprese pouze *CD46* v porovnání s normálním nálezem. Vyšší exprese *CD59* tak pravděpodobně představuje ochranný mechanismus před poškozením tkáně komplementem. Naši hypotézu potvrdila i nedávná studie na myším modelu ABO inkompatibilních transplantací srdce, kdy autoři vyvolali akomodaci kombinací právě inhibitoru C5 složky komplementu a udržovací imunosuprese (CNI inhibitory, mykofenolát mofetil a steroidy)<sup>105</sup>.

### 5.3. URČENÍ FENOTYPU VASKULÁRNÍ REJEKCE

---

*Wohlfahrtova M, Hrubá P, Klema J, Novotný M, Krejčík Z, Stranecký V, Honsová E, Vichová P, Viklický O. Early isolated V-lesion may not truly represent rejection of the kidney allograft. Clinical science. 2018, 132(20), 2269-2284. IF 5,237.*

Cíle této práce bylo pomocí transkriptomických metod určit fenotyp akutní rejekce s vaskulárním postižením. Akutní rejekce s vaskulárním postižením se projevuje histologicky tzv. intimální arteritidou (tzv. v-lézi), při níž dochází k infiltraci stěn cév zánětlivými elementy. Intimální arteritida může být projevem T-buňkami i protilátkami zprostředkované rejekce<sup>106</sup> a někdy bývá problematické správně určit, o jaký typ rejekce se jedná. To hraje ale zásadní roli v nastavení správné léčby. V-léze se ale může vyskytovat i izolovaně, tedy bez nebo jen s mírným tubulointersticiálním zánětem, což je však dle Banffské klasifikace vyhodnoceno jako T-buňkami zprostředkovaná rejekce a adekvátně léčeno. Nicméně je pravděpodobné, že řada těchto „izolovaných v-lézí“ má benigní charakter<sup>11, 107, 108</sup>. Cílem této práce bylo zjistit rozdíly v transkriptomu mezi klasickou vaskulární rejekcí s tubulointersticiálním zánětem a izolovanou v-lézí s minimálním nebo žádným tubulointersticiálním zánětem v období brzy po transplantaci. Molekulární profil

biopsií vaskulární rejekce s tubulointersticiálním zánětem prokázal významně vyšší aktivaci vrozené a adaptivní imunity a zánětu v časných nálezech ve srovnání s izolovanou v-lézí, čímž jsme potvrdili nerejekční původ izolované v-léze<sup>37</sup>.

## 6. SOUHRN

---

Výsledky předkládaných prací podporují začlenění metod molekulární analýzy do diagnostiky patologie ledvinných štěpů, a to zejména u nejasných diagnóz (hraniční změny, v-léze) nebo pro lepší porozumění patofyziologie daného procesu (akomodace u ABO inkompatibilních transplantací). To je v souladu i s posledními aktualizacemi Banffské klasifikace<sup>7, 8</sup>, které uvádějí molekulární vyšetření transkriptomu jako jedno z kritérií protilátkami zprostředkované rejekce.

1. Řešení projektu, který měl za cíl identifikovat progresivní fenotyp u diagnózy hraničních změn po transplantaci ledviny přineslo několik nových poznatků:

Hraniční změny představují velmi heterogenní diagnostický nález. Riziko selhání štěpu po nálezu hraničních změn je vyšší u pacientů, kteří dostali ledvinu od staršího dárce, kteří měli opožděnou funkci štěpu a u nichž byly hraniční změny diagnostikovány v indikační biopsii časně po transplantaci.

Vliv marginálního dárce na osud ledviny po diagnóze hraničních změn v časně indikační biopsii jsme potvrdili i na molekulární úrovni. Pacienti, kteří dostali ledvinu od marginálního dárce, měli významně zvýšenou expresi transkriptů asociovaných s akutním poškozením ledvin a zánětlivou odpovědí. Naše výsledky tedy podporují používání depleční indukční léčby Thymoglobulinem u příjemců štěpů od marginálních dárců.

Ukázali jsme, že tzv. izolovaná tubulitida, která až do konce roku 2019 dle Banffské klasifikace představovala podkategorii hraničních změn, má nižší expresi transkriptů asociovaných se zánětem (metodou RNA sekvenování a molekulárního mikroskopu). Nicméně i v rámci kategorie izolované tubulitidy jsme pomocí molekulárního mikroskopu identifikovali rejekční fenotypy, i když v menší míře než u tubulitidy s intersticiálním zánětem.

Analýza sekvenčních biopsií metodou molekulárního mikroskopu potvrdila heterogenitu tohoto histologického nálezu. Šedesát pět procent biopsií s hraničními změnami mělo negativní rejekční molekulární skóre v první i v následné biopsii. U části biopsií s pozitivním rejekčním molekulárním skóre došlo k jeho poklesu a u části zůstalo pozitivní i ve 3. měsíci. Nejvýznamnějším prediktorem molekulární rejekce ve 3. měsíci bylo vyšší molekulární skóre pro tubulitidu v indikační biopsii.

2. U pacientů po ABOi transplantaci ledviny s akomodací jsme zjistili nižší expresi několika epiteliálních transportérů a metalotioneinů v porovnání s pacienty se znaky subklinické protilátkami zprostředkované rejekce. Pacienti s akomodací měli vyšší expresi *CD59*, což zřejmě představuje ochranný mechanismus před poškozením tkáně komplementem.

3. Analýzou transkriptomu jsme potvrdili benigní molekulární profil izolované v-léze ledvinných štěpů.



## 7. REFERENCE

---

1. Coemans M, Susal C, Dohler B, *et al.* Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int* 2018; **94**: 964-973.
2. Sellares 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**: 388-399.
3. Naik RH, Shawar SH. Renal Transplantation Rejection. *StatPearls*: Treasure Island (FL), 2021.
4. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, *et al.* International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; **44**: 411-422.
5. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; **55**: 713-723.
6. 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**: 272-283.
7. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, *et al.* The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant* 2018; **18**: 293-307.
8. Loupy A, Haas M, Roufosse C, *et al.* The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2020; **20**: 2318-2331.
9. Sellares J, Reeve J, Loupy A, *et al.* Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant* 2013; **13**: 971-983.
10. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, *et al.* Inflammation lesions in kidney transplant biopsies: association with survival is due to the underlying diseases. *Am J Transplant* 2011; **11**: 489-499.
11. Salazar ID, Merino Lopez M, Chang J, *et al.* Reassessing the Significance of Intimal Arteritis in Kidney Transplant Biopsy Specimens. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**: 3190-3198.

12. Schinstock CA, Mannon RB, Budde K, *et al.* Recommended Treatment for Antibody-mediated Rejection After Kidney Transplantation: The 2019 Expert Consensus From the Transplantation Society Working Group. *Transplantation* 2020; **104**: 911-922.
13. Barnett AN, Hadjianastassiou VG, Mamode N. Rituximab in renal transplantation. *Transpl Int* 2013; **26**: 563-575.
14. Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, *et al.* Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant* 2009; **9**: 201-209.
15. Park WD, Grande JP, Ninova D, *et al.* Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. *Am J Transplant* 2003; **3**: 952-960.
16. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009; **10**: 57-63.
17. Zhao S, Zhang Y, Gamini R, *et al.* Evaluation of two main RNA-seq approaches for gene quantification in clinical RNA sequencing: polyA+ selection versus rRNA depletion. *Sci Rep* 2018; **8**: 4781.
18. Mastrokolias A, den Dunnen JT, van Ommen GB, *et al.* Increased sensitivity of next generation sequencing-based expression profiling after globin reduction in human blood RNA. *BMC Genomics* 2012; **13**: 28.
19. Schena M, Shalon D, Davis RW, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; **270**: 467-470.
20. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 2008; **5**: 621-628.
21. Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am J Hum Genet* 2009; **85**: 142-154.
22. Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, *et al.* Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS One* 2014; **9**: e78644.
23. Rao MS, Van Vleet TR, Ciurlionis R, *et al.* Comparison of RNA-Seq and Microarray Gene Expression Platforms for the Toxicogenomic Evaluation of Liver From Short-Term Rat Toxicity Studies. *Front Genet* 2018; **9**: 636.

24. Wang C, Gong B, Bushel PR, *et al.* The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. *Nat Biotechnol* 2014; **32**: 926-932.
25. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, *et al.* Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003; **349**: 125-138.
26. Flechner SM, Kurian SM, Head SR, *et al.* Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1475-1489.
27. Mueller TF, Einecke G, Reeve J, *et al.* Microarray analysis of rejection in human kidney transplants using pathogenesis-based transcript sets. *Am J Transplant* 2007; **7**: 2712-2722.
28. Yazdani S, Callemeyn J, Gazut S, *et al.* Natural killer cell infiltration is discriminative for antibody-mediated rejection and predicts outcome after kidney transplantation. *Kidney Int* 2019; **95**: 188-198.
29. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, *et al.* Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). *Am J Transplant* 2013; **13**: 2865-2874.
30. Hayde N, Bao Y, Pullman J, *et al.* The clinical and molecular significance of C4d staining patterns in renal allografts. *Transplantation* 2013; **95**: 580-588.
31. Reeve J, Sellares J, Mengel M, *et al.* Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am J Transplant* 2013; **13**: 645-655.
32. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, *et al.* Potential impact of microarray diagnosis of T cell-mediated rejection in kidney transplants: The INTERCOM study. *Am J Transplant* 2013; **13**: 2352-2363.
33. Lubetzky M, Hayde N, P OB, *et al.* Molecular signatures and clinical outcomes of transplant glomerulopathy stratified by microvascular inflammation and donor-specific antibody. *Clin Transplant* 2019; **33**: e13469.
34. Hrubá P, Krejčík Z, Stranecký V, *et al.* Molecular Patterns Discriminate Accommodation and Subclinical Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Transplantation* 2019; **103**: 909-917.
35. de Freitas DG, Sellares J, Mengel M, *et al.* The nature of biopsies with "borderline rejection" and prospects for eliminating this category. *Am J Transplant* 2012; **12**: 191-201.

36. Hrubá P, Brabcová I, Gueler F, *et al.* Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney Int* 2015; **88**: 785-795.
37. Wohlfahrtová M, Hrubá P, Klema J, *et al.* Early isolated V-lesion may not truly represent rejection of the kidney allograft. *Clin Sci (Lond)* 2018; **132**: 2269-2284.
38. Famulski KS, de Freitas DG, Kreepala C, *et al.* Molecular phenotypes of acute kidney injury in kidney transplants. *J Am Soc Nephrol* 2012; **23**: 948-958.
39. Maluf DG, Dumur CI, Suh JL, *et al.* Evaluation of molecular profiles in calcineurin inhibitor toxicity post-kidney transplant: input to chronic allograft dysfunction. *Am J Transplant* 2014; **14**: 1152-1163.
40. O'Connell PJ, Zhang W, Menon MC, *et al.* Biopsy transcriptome expression profiling to identify kidney transplants at risk of chronic injury: a multicentre, prospective study. *Lancet* 2016; **388**: 983-993.
41. Einecke G, Reeve J, Sis B, *et al.* A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J Clin Invest* 2010; **120**: 1862-1872.
42. Kamal L, Broin PO, Bao Y, *et al.* Clinical, Histological, and Molecular Markers Associated With Allograft Loss in Transplant Glomerulopathy Patients. *Transplantation* 2015; **99**: 1912-1918.
43. Scian MJ, Maluf DG, Archer KJ, *et al.* Gene expression changes are associated with loss of kidney graft function and interstitial fibrosis and tubular atrophy: diagnosis versus prediction. *Transplantation* 2011; **91**: 657-665.
44. Hrubá P, Madill-Thomsen K, Macková M, *et al.* Three-months course of intragraft transcriptional changes in kidney allografts with early histological minimal injury. *Transpl Int* 2021.
45. Famulski KS, Einecke G, Reeve J, *et al.* Changes in the transcriptome in allograft rejection: IFN-gamma-induced transcripts in mouse kidney allografts. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1342-1354.
46. Hidalgo LG, Sellares J, Sis B, *et al.* Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. *Am J Transplant* 2012; **12**: 1180-1191.
47. Einecke G, Reeve J, Mengel M, *et al.* Expression of B cell and immunoglobulin transcripts is a feature of inflammation in late allografts. *Am J Transplant* 2008; **8**: 1434-1443.
48. Venner JM, Famulski KS, Reeve J, *et al.* Relationships among injury, fibrosis, and time in human kidney transplants. *JCI Insight* 2016; **1**: e85323.

49. Einecke G, Reeve J, Halloran PF. A molecular biopsy test based on arteriolar under-hyalinosis reflects increased probability of rejection related to under-immunosuppression. *Am J Transplant* 2018; **18**: 821-831.
50. Roedder S, Sigdel T, Salomonis N, *et al.* The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. *PLoS Med* 2014; **11**: e1001759.
51. Christakoudi S, Runglall M, Mobillo P, *et al.* Development of a multivariable gene-expression signature targeting T-cell-mediated rejection in peripheral blood of kidney transplant recipients validated in cross-sectional and longitudinal samples. *EBioMedicine* 2019; **41**: 571-583.
52. Friedewald JJ, Kurian SM, Heilman RL, *et al.* Development and clinical validity of a novel blood-based molecular biomarker for subclinical acute rejection following kidney transplant. *Am J Transplant* 2019; **19**: 98-109.
53. Zhang W, Yi Z, Keung KL, *et al.* A Peripheral Blood Gene Expression Signature to Diagnose Subclinical Acute Rejection. *J Am Soc Nephrol* 2019.
54. Van Loon E, Gazut S, Yazdani S, *et al.* Development and validation of a peripheral blood mRNA assay for the assessment of antibody-mediated kidney allograft rejection: A multicentre, prospective study. *EBioMedicine* 2019.
55. Halloran PF, Reeve JP, Pereira AB, *et al.* Antibody-mediated rejection, T cell-mediated rejection, and the injury-repair response: new insights from the Genome Canada studies of kidney transplant biopsies. *Kidney Int* 2014; **85**: 258-264.
56. Reeve J, Bohmig GA, Eskandary F, *et al.* Generating automated kidney transplant biopsy reports combining molecular measurements with ensembles of machine learning classifiers. *Am J Transplant* 2019; **19**: 2719-2731.
57. Madill-Thomsen KS, Wiggins RC, Eskandary F, *et al.* The Effect of Cortex/Medulla Proportions on Molecular Diagnoses in Kidney Transplant Biopsies: Rejection and Injury Can Be Assessed in Medulla. *Am J Transplant* 2017; **17**: 2117-2128.
58. Hayde N, Broin PO, Bao Y, *et al.* Increased intragraft rejection-associated gene transcripts in patients with donor-specific antibodies and normal biopsies. *Kidney Int* 2014; **86**: 600-609.
59. Venner JM, Hidalgo LG, Famulski KS, *et al.* The molecular landscape of antibody-mediated kidney transplant rejection: evidence for NK involvement through CD16a Fc receptors. *Am J Transplant* 2015; **15**: 1336-1348.

60. Halloran PF, Reeve J, Akalin E, *et al.* Real Time Central Assessment of Kidney Transplant Indication Biopsies by Microarrays: The INTERCOMEX Study. *Am J Transplant* 2017; **17**: 2851-2862.
61. Hrubá P, Krejčík Z, Dostalová Merkerová M, *et al.* Molecular Fingerprints of Borderline Changes in Kidney Allografts Are Influenced by Donor Category. *Front Immunol* 2020; **11**: 423.
62. Cippa PE, Sun B, Liu J, *et al.* Transcriptional trajectories of human kidney injury progression. *JCI Insight* 2018; **3**.
63. Hrubá P, Madill-Thomsen K, Macková M, *et al.* Molecular patterns of isolated tubulitis differ from tubulitis with interstitial inflammation in early indication biopsies of kidney allografts. *Sci Rep* 2020; **10**: 22220.
64. Pineda S, Sur S, Sigdel T, *et al.* Peripheral Blood RNA Sequencing Unravels a Differential Signature of Coding and Noncoding Genes by Types of Kidney Allograft Rejection. *Kidney Int Rep* 2020; **5**: 1706-1721.
65. Zhang W, Yi Z, Keung KL, *et al.* A Peripheral Blood Gene Expression Signature to Diagnose Subclinical Acute Rejection. *J Am Soc Nephrol* 2019; **30**: 1481-1494.
66. Zhang W, Yi Z, Wei C, *et al.* Pretransplant transcriptomic signature in peripheral blood predicts early acute rejection. *JCI Insight* 2019; **4**.
67. Jeon HJ, Lee JG, Kim K, *et al.* Peripheral blood transcriptome analysis and development of classification model for diagnosing antibody-mediated rejection vs accommodation in ABO-incompatible kidney transplant. *Am J Transplant* 2020; **20**: 112-124.
68. Dorr C, Wu B, Guan W, *et al.* Differentially expressed gene transcripts using RNA sequencing from the blood of immunosuppressed kidney allograft recipients. *PLoS One* 2015; **10**: e0125045.
69. Kurian SM, Velazquez E, Thompson R, *et al.* Orthogonal Comparison of Molecular Signatures of Kidney Transplants With Subclinical and Clinical Acute Rejection: Equivalent Performance Is Agnostic to Both Technology and Platform. *Am J Transplant* 2017; **17**: 2103-2116.
70. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, *et al.* Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 317-325.
71. Toulza F, Dominy K, Cook T, *et al.* Technical considerations when designing a gene expression panel for renal transplant diagnosis. *Sci Rep* 2020; **10**: 17909.

72. Halloran P FK, Reeve J, Huang J, Alexandrov N. Microarray and RNA-Seq Analysis of Rejection in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Biopsies: Comparing FFPE to Conventionally Stabilized (RNAlater Solution) Biopsies. *Am J Transplant* 2020; **20 (Suppl. 3)**.
73. Liu P, Tseng G, Wang Z, *et al.* Diagnosis of T-cell-mediated kidney rejection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using RNA-Seq-based machine learning algorithms. *Hum Pathol* 2019; **84**: 283-290.
74. Sigdel T, Nguyen M, Liberto J, *et al.* Assessment of 19 Genes and Validation of CRM Gene Panel for Quantitative Transcriptional Analysis of Molecular Rejection and Inflammation in Archival Kidney Transplant Biopsies. *Front Med (Lausanne)* 2019; **6**: 213.
75. Dominy KM, Willicombe M, Al Johani T, *et al.* Molecular Assessment of C4d-Positive Renal Transplant Biopsies Without Evidence of Rejection. *Kidney Int Rep* 2019; **4**: 148-158.
76. Macosko EZ, Basu A, Satija R, *et al.* Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* 2015; **161**: 1202-1214.
77. Cohen CD, Grone HJ, Grone EF, *et al.* Laser microdissection and gene expression analysis on formaldehyde-fixed archival tissue. *Kidney Int* 2002; **61**: 125-132.
78. Tycova I, Hrubá P, Maixnerová D, *et al.* Molecular profiling in IgA nephropathy and focal and segmental glomerulosclerosis. *Physiol Res* 2018; **67**: 93-105.
79. Malone AF, Wu H, Humphreys BD. Bringing Renal Biopsy Interpretation Into the Molecular Age With Single-Cell RNA Sequencing. *Semin Nephrol* 2018; **38**: 31-39.
80. Liao J, Yu Z, Chen Y, *et al.* Single-cell RNA sequencing of human kidney. *Sci Data* 2020; **7**: 4.
81. Wu H, Malone AF, Donnelly EL, *et al.* Single-Cell Transcriptomics of a Human Kidney Allograft Biopsy Specimen Defines a Diverse Inflammatory Response. *J Am Soc Nephrol* 2018; **29**: 2069-2080.
82. Meehan SM, Siegel CT, Aronson AJ, *et al.* The relationship of untreated borderline infiltrates by the Banff criteria to acute rejection in renal allograft biopsies. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 1806-1814.
83. Matoza JR, Danguilan RA, Chicano S. Impact of Banff borderline acute rejection among renal allograft recipients. *Transplant Proc* 2008; **40**: 2303-2306.
84. Viklicky O, Krystufkova E, Brabcova I, *et al.* B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation* 2013; **95**: 148-154.

85. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; **55**: 713-723.
86. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, *et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; **7**: 518-526.
87. Nankivell BJ, P'Ng CH, Chapman JR. Does tubulitis without interstitial inflammation represent borderline acute T cell mediated rejection? *Am J Transplant* 2019; **19**: 132-144.
88. Nankivell BJ, Agrawal N, Sharma A, *et al.* The clinical and pathological significance of borderline T cell-mediated rejection. *Am J Transplant* 2019; **19**: 1452-1463.
89. Dahan K, Audard V, Roudot-Thoraval F, *et al.* Renal allograft biopsies with borderline changes: predictive factors of clinical outcome. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1725-1730.
90. Brennan DC, Malone, A. : Kidney transplantation in adults: Treatment of acute T cell-mediated (cellular) rejection of the renal allograft In *UpToDate*, UpToDate, Waltham, MA., Accessed on April 8, 2021
91. Mehta RB, Tandukar S, Jorgensen D, *et al.* Early subclinical tubulitis and interstitial inflammation in kidney transplantation have adverse clinical implications. *Kidney Int* 2020; **98**: 436-447.
92. Seifert ME, Agarwal G, Bernard M, *et al.* Impact of Subclinical Borderline Inflammation on Kidney Transplant Outcomes. *Transplant Direct* 2021; **7**: e663.
93. McRae M, Bouchard-Boivin F, Beland S, *et al.* Impact of the Current Versus the Previous Diagnostic Threshold on the Outcome of Patients With Borderline Changes Suspicious for T Cell-mediated Rejection Diagnosed on Indication Biopsies. *Transplantation* 2018; **102**: 2120-2125.
94. Dale LA, Brennan C, Batal I, *et al.* Treatment of borderline infiltrates with minimal inflammation in kidney transplant recipients has no effect on allograft or patient outcomes. *Clin Transplant* 2020; **34**: e14019.
95. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, *et al.* Potential impact of microarray diagnosis of T cell-mediated rejection in kidney transplants: The INTERCOM study. *Am J Transplant* 2013; **13**: 2352-2363.
96. Halloran PF, Reeve J, Akalin E, *et al.* Real Time Central Assessment of Kidney Transplant Indication Biopsies by Microarrays: The INTERCOMEX Study. *Am J Transplant* 2017; **17**: 2851-2862.



97. Reeve J, Bohmig GA, Eskandary F, *et al.* Assessing rejection-related disease in kidney transplant biopsies based on archetypal analysis of molecular phenotypes. *JCI Insight* 2017; **2**.
98. Chamoun B, Caraben A, Torres IB, *et al.* A Rejection Gene Expression Score in Indication and Surveillance Biopsies Is Associated with Graft Outcome. *Int J Mol Sci* 2020; **21**.
99. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; **4**: 44-57.
100. Loupy A, Haas M, Roufosse C, *et al.* The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2020; **20**: 2318-2331.
101. Viklicky O, Parikova A, Slatinska J, *et al.* [ABO incompatible kidney transplantation - first experiences]. *Vnitr Lek* 2015; **61**: 725-730.
102. Tyden G, Kumlien G, Genberg H, *et al.* ABO incompatible kidney transplantations without splenectomy, using antigen-specific immunoabsorption and rituximab. *Am J Transplant* 2005; **5**: 145-148.
103. Opelz G, Morath C, Susal C, *et al.* Three-year outcomes following 1420 ABO-incompatible living-donor kidney transplants performed after ABO antibody reduction: results from 101 centers. *Transplantation* 2015; **99**: 400-404.
104. Osickova K, Parikova A, Maluskova J, *et al.* Similar Microvascular Inflammation and Tubulointerstitial Injury in ABO-Incompatible and Matched ABO-Compatible Kidney Allografts. *Transplant Proc* 2018; **50**: 1305-1309.
105. Park S, Lee JG, Jang JY, *et al.* Induction of Accommodation by Anti-complement Component 5 Antibody-based Immunosuppression in ABO-incompatible Heart Transplantation. *Transplantation* 2019; **103**: e248-e255.
106. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, *et al.* Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet* 2013; **381**: 313-319.
107. Novotny M, Hrubá P, Vichová P, *et al.* Isolated v-lesion represents a benign phenotype of vascular rejection of the kidney allograft - a retrospective study. *Transpl Int* 2018; **31**: 1153-1163.
108. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, *et al.* Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009; **9**: 2312-2323.

## 8. VYBRANÉ KOMENTOVANÉ PUBLIKACE

---

HRUBÁ, P., BRABCOVÁ, I., GUELER, F., KREJČÍK, Z., STRÁNECKÝ, V., SVOBODOVÁ, E., MALUŠKOVÁ, J., GWINNER, W., HONSOVÁ, E., LODEREROVÁ, A., OBERBAUER, R., ZACHOVAL, R., VIKLICKÝ, O. Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney International*. 2015, **88**(4), 785-795. ISSN 0085-2538. e-ISSN 1523-1755. IF 7,683.

HRUBÁ, P., KREJČÍK, Z., DOSTALOVÁ, MM., KLÉMA, J., STRÁNECKÝ, V., SLATINSKÁ, J., MALUŠKOVÁ, J., HONSOVÁ, E., VIKLICKÝ, 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.

HRUBÁ, P., MADILL-THOMSEN, K., MACKOVÁ, M., KLÉMA, 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), nestránkováno. ISSN 2045-2322. IF 3,998.

HRUBÁ, P., MADILL-THOMSEN, K., MACKOVÁ, M., MALUŠKOVÁ, J., VOSKA, L., SLATINSKÁ, J., HALLORAN, P., VIKLICKÝ, O. Three-months course of intragraft transcriptional changes in kidney allografts with early histological minimal injury - a cohort study. *Transplant International*. 2021, doi: 10.1111/tri.13856. IF 3,177.

HRUBÁ, P., KREJČÍK, Z., STRÁNECKÝ, V., MALUŠKOVÁ, J., SLATINSKÁ, J., GUELER, F., GWINNER, W., BRÄSEN, J., WOHLFAHRTOVÁ, M., PAŘÍKOVÁ, A., OSIČKOVÁ, K., FRONĚK, J., ŠEDA, 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.

WOHLFAHRTOVÁ, M., HRUBÁ, P., KLÉMA, J., NOVOTNÝ, M., KREJČÍK, Z., STRÁNECKÝ, V., HONSOVÁ, E., VÍCHOVÁ, P., VIKLICKÝ, O. Early isolated V-lesion may not truly represent rejection of the kidney allograft. *Clinical science*. 2018, **132**(20), 2269-2284. ISSN 0143-5221. IF 5,237.