Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie

MUDr. Jan Balko

Zpřesnění tkáňové diagnostiky v transplantačním programu

Refinement of tissue diagnostics in the transplant program

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Josef Zámečník, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 3. 3. 2023

Jan BALKO

Poděkování:

Na tomto místě bych v první řadě rád poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Josefu Zámečníkovi, Ph.D. z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol. Mé poděkování za spolupráci a podporu patří i prim. MUDr. Petru Škapovi, Ph.D. a MUDr. Márii Chadimové z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol a doc. MUDr. Romanu Chmelovi, Ph.D., MHA z Gynekologicko-porodnické kliniky 2. LF UK a FN Motol.

Zpřesnění tkáňové diagnostiky v transplantačním programu

Abstrakt

V této práci se zabýváme tkáňovou diagnostikou transplantovaných orgánů pocházejících od dárců i příjemců. U darovaných orgánů (graftů) jsme se zaměřili na upřesnění dosud provizorního skórovacího systému rejekčních změn v programu transplantace dělohy. Pomocí histopatologické diagnostiky, včetně imunohistochemických metod, jsme porovnali nálezy lymfocytárních infiltrátů uváděných ve zmíněném skórovacím systému s nálezy v resekátech děloh žen po hysterektomii provedené z důvodů nesouvisejících s děložním hrdlem. Cílem naší práce bylo ověřit platnost tzv. kategorie borderline změn – morfologický obraz těchto změn se však ukázal být překryvným s fyziologickým nálezem ve zdravém děložním hrdle a tudíž nevyžadujícím imunosupresivní terapii. U orgánů příjemců jsme se zaměřili na roli plicních megakaryocytů v explantátech po transplantaci plic. Cílem bylo přispět k ozřejmění patogeneze chorob vedoucích k nutnosti této transplantace. Plicní megakaryocyty jsme histopatologicky a imunohistochemicky mapovali ve vzorcích plicních explantátů příjemců s různými základními plicními chorobami a objevili jejich výrazně zvýšenou účast u vaskulárních plicních lézí. U idiopatické plicní hypertenze by tento nález mohl pomoci vysvětlit dosud kryptogenní cévní přestavbu. Tato práce ukazuje, že v obou oblastech transplantační medicíny má histopatologické vyšetření stále důležitou úlohu a poskytuje transplantačnímu týmu cenné a jiným způsobem nezjistitelné informace.

Klíčová slova: borderline rejekční změny, idiopatická plicní hypertenze, plicní megakaryocyty, transplantace dělohy, transplantace plic.

Refinement of tissue diagnostics in the transplant program

Abstract

The thesis describes tissue diagnostics of organ transplants of the donor as well as recipient. In case of donated organs (grafts), it aims to improve the provisional scoring system of graft rejection after uterine transplantation. Using histopathological methods including immunohistochemistry, it compares lymphocytic population classified in the scoring system with histopathological findings within the resected uteri of women who underwent hysterectomy for benign reasons. The aim was to validate the necessity of the category of so called borderline changes, whose morphology was proven to overlap with physiological finding within healthy uterine cervix. Therefore, there is no need for immunosuppressive therapy in such cases. In case of recipients, the thesis investigates the role of pulmonary megakaryocytes in explanted lungs after transplantation. The idea was to elucidate pathogenesis of the diseases leading to the need of transplantation itself. Pulmonary megakaryocytes within explanted lungs of various recipients were mapped using histopathological methods and immunohistochemistry. The strikingly increased number of such cells was detected among vascular disorders, especially idiopathic pulmonary hypertension. This finding could contribute to the explanation of vascular remodelling in this so far cryptogenic disease. In both cases, this thesis shows the importance of histopathological examination, which provides valuable information to the transplant team, undetectable via another method.

Keywords: borderline rejection, idiopathic pulmonary hypertension, lung transplantation, pulmonary megakaryocytes, uterus transplantation.

Seznam zkratek

ACR	akutní celulární rejekce
AMR	antibody mediated rejection
AUFI	absolutní uterinní faktor infertility
BOS	bronchiolitis obliterans syndrom
CF	cystická fibróza
CLAD	chronic lung allograft dysfunction
COP	cryptogenic organizing pneumonia
CPFE	combined pulmonary fibrosis and emphysema
DAD	diffuse alveolar damage
DLTx	double lung transplantation
DSA	donor specific antibodies
EAA	exogenní alergická alveolitida
FEV_1	forced expiratory volume in 1 second
FVC	forced vital capacity
H&E	hematoxylin-eozin
HLA	human leukocyte antigen
HPV	human papillomavirus
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IHC	imunohistochemie
IPAH	idiopatická plicní hypertenze
IPF	idiopatická plicní fibróza
LTx	lung transplantation
NSIP	nespecifická intersticiální pneumonie
PKH	plicní kapilární hemangiomatóza
PPFE	pleuroparenchymální fibroelastóza
RAS	restrictive allograft syndrome
RPP	revmatoidní plicní postižení
SLTx	single lung transplantation
TLC	total lung capacity
UTx	uterus transplantation
VON	veno-okluzivní nemoc

OBSAH

1 ÚVOD 10
1.1 Úloha patologa v transplantačním programu 10
1.1.1 Bioptická diagnostika orgánu dárce 10
1.1.2 Bioptická diagnostika orgánu příjemce 11
1.1.3 Nekroptická diagnostika orgánu dárce i příjemce 11
1.2 Transplantace dělohy 12
1.2.1 Tkáňová diagnostika dělohy příjemkyně 14
1.2.2 Tkáňová diagnostika dělohy dárkyně 15
1.2.2.1 Diagnostika rejekce v rámci UTx 15
1.3 Transplantace plic 17
1.3.1 Tkáňová diagnostika plic příjemce 20
1.3.2 Tkáňová diagnostika plic dárce 21
1.3.2.1 Diagnostika hyperakutní rejekce v rámci LTx 22
1.3.2.2 Diagnostika akutní (celulární) rejekce v rámci LTx 23
1.3.2.3 Diagnostika chronické rejekce v rámci LTx 26
1.3.2.4 Diagnostika humorální rejekce v rámci LTx 28
2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY 29
2.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh 29
2.1.1 Hypotéza 29
2.1.2 Cíle práce 29
2.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci 30
2.2.1 Hypotéza 30
2.2.2 Cíle práce 31
3 METODIKA 32
3.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh 32
3.1.1 Kohorta pacientek 32
3.1.2 Histopatologické vyšetření 33
3.1.3 Imunohistochemie (IHC) 33
3.1.4 Semikvantitativní skórovací systém 34
3.1.5 Etické aspekty 36
3.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci 37

3.2.1 Kohorta pacientů 37
3.2.2 Histopatologické vyšetření 38
3.2.3 Imunohistochemie 39
3.2.4 Statistické vyhodnocení 39
4 VÝSLEDKY 41
4.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh 41
4.1.1 Ektocervikální nálezy 41
4.1.2 Endocervikální nálezy 47
4.1.3 Vliv menstruačního cyklu na lymfocytární infiltráty v ektocervixu 49
4.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci 51
4.2.1 Výsledky kontrolní skupiny kadaverózních dárců 51
4.2.2 Výsledky jednotlivých skupin příjemců 52
5 DISKUZE 58
5.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh 58
5.1.1 Charakteristika cervikálních lymfocytárních infiltrátů a význam borderline změn 58
5.1.2 Imunohistochemický profil cervikálních lymfocytárních infiltrátů 59
5.1.3 Rozdíly mezi ektocervikálními a endocervikálními nálezy 61
5.1.4 Role menstruačního cyklu na cervikální lymfocytární populace 61
5.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci 62
5.2.1 Výzkumné využití bioptického materiálu z LTx programu 62
5.2.2 Průměrné počty plicních megakaryocytů 63
5.2.3 Plicní megakaryocyty příjemců s vaskulárními plicními chorobami 63
5.2.4 Plicní megakaryocyty příjemců s restrikčními a obstrukčními plicními chorobami 64
5.2.5 Silné a slabé stránky experimentu 65
6 ZÁVĚR 67
7 SHRNUTÍ 68
7.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh 68
7.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci 68
8 SUMMARY 70
8.1 Experiment 1: Histopathological analysis of the ectocervical biopsy in non-transplanted uteri and correlation of the results to the provisional scoring system of subclinical graft rejection after uterus transplantation 70

8.2 Experiment 2: Mapping of the pulmonary megakaryocytes in explanted lungs after transplantation 70
9 LITERATURA 71
10 SEZNAM PUBLIKACÍ 80
11 PŘÍLOHY 83

1 ÚVOD

1.1 Úloha patologa v transplantačním programu

Transplantační program představuje vysoce specializovanou a dynamickou oblast chirurgie, která v současné době vyžaduje multidisciplinární přístup se zapojením řady oborů do tzv. transplantačního týmu, jehož součástí nutně musí být i patolog. V rámci transplantačního týmu totiž patolog představuje klíčový článek, jehož stěžejním úkolem je tkáňová diagnostika orgánů dárce (donora) i příjemce (recipienta) (Valente et al., 2006). Nejzásadnější roli hraje bioptické ověření darovaného orgánu (tj. štěpu/graftu), protože na základě histopatologické diagnózy se v tomto případě pro chirurga odvíjí celý následný management pacienta i terapeutický postup. Žádné méně invazivní metodě se zatím nepodařilo histopatologické vyšetření v diagnostice rejekce zcela nahradit (Veta et al., 2021).

1.1.1 Bioptická diagnostika orgánu dárce

K určení správné diagnózy štěpu patolog využívá histopatologických metod a mikroskopického vyšetření, prostřednictvím kterých odlišuje potenciální rejekční, či nerejekční poškození. Výsledná diagnóza musí být spolehlivá, protože terapie rejekce a infekcí (coby nejčastějšího typu nerejekčního poškození graftu) je v podstatě protichůdná. V případě průkazu rejekce (odhojení graftu) klinik nasazuje antirejekční imunosupresivní léčbu, která naopak usnadňuje vznik infekčních komplikací. Úkolem každého transplantologa je tudíž odpovídajícím způsobem vyvážit antirejekční a anti-infekční léčbu pacienta na základě diagnóz stanovených patologem. Toto pravidlo obecně platí pro prakticky všechny typy orgánových transplantací, u nichž je stanovení rejekce závislé na invazivním bioptickém odběru tkání štěpu.

Biopsie graftu se zpravidla dělí na tzv. protokolární a akutní. Protokolárně se odebírají biopsie u všech pacientů po určitých časových intervalech od transplantace a slouží k zhodnocení přijmutí štěpu příjemcem. Jednotlivá specifika, tj. počet a načasování odběrů, se liší v závislosti na transplantovaném orgánu i mezi jednotlivými pracovišti. Akutní biopsie se nabírají kdykoli dojde ke klinickému zhoršení stavu pacienta, jež by mohlo být způsobeno rejekcí. Bioptické vyšetření chirurgovi pomáhá takové případy odhalit (Swanson and Wallace, 2014).

V rámci vybraných orgánových transplantací (např. ledvin) se rozlišuje ještě další speciální tkáňový odběr dárce, tzv. „biopsie nulté hodiny“ („zero-hour graft biopsy“), která slouží k posouzení celkového stavu a případného subklinického (a jiným způsobem nedetekovatelného) poškození štěpu těsně před samotnou transplantací (Rathore et al., 2017).

1.1.2 Bioptická diagnostika orgánu příjemce

Bioptické ověření se však týká i vyjmutého původního orgánu příjemce. Součástí samotné transplantace je tzv. explantace příjemcova postiženého orgánu, který je následně zaslán na příslušný ústav patologie k bioptickému vyšetření obdobným způsobem jako jiné chirurgicky resekované orgány. V těchto případech samozřejmě patolog neposuzuje rejekční změny, ale jeho úlohou je potvrdit původní diagnózu choroby, která primárně vedla k samotné transplantaci. Vzhledem ke zpravidla hojnému množství materiálu dovoluje výsledek daného vyšetření často i mnohem detailnější ozřejmění původní léze, než umožnily předchozí klinické a zobrazovací metody (Bravo et al., 2005) či iniciální bioptický odběr před transplantací (Razia et al., 2022). Explantované orgány tímto také představují bohatý zdroj biologického materiálu pro výzkum etiopatogeneze a morfologických znaků zmíněných chorob, protože jimi postižené tkáně nebývají v takovém množství jiným způsobem dostupné. Současně s explantovaným orgánem příjemce může být chirurgem zaslána i část orgánu dárce, která nebyla využita pro transplantaci (např. z důvodu přílišné velikosti graftu). V takových případech posuzuje patolog stav obou orgánů, což dovoluje předpovídat přijetí graftu příjemcem a jeho posttransplantační stav (Aigner et al., 2005).

1.1.3 Nekroptická diagnostika orgánu dárce i příjemce

Pro kompletnost nelze nezmínit i třetí roli, kterou patolog v transplantační medicíně zastává, a totiž nekroptické vyšetření orgánů dárce i příjemce. Nekropsie transplantovaných pacientů se vyšetřují v rámci patologicko-anatomické pitvy. Stran příjemce slouží pitva k objasnění důvodů vedoucích k potenciálnímu selhání štěpu či jiné příčině smrti pacienta. V současné době dochází k selhání štěpu zejména kvůli infekčním komplikacím při iatrogenně navozené imunosupresi či působením chronické rejekce. Posuzování případných rejekčních změn v nekropsii využívá stejné postupy a klasifikační systémy jako při bioptickém vyšetření.

Nekroptické vyšetření těl dárců představuje v transplantační patologii marginální záležitost, která dovoluje zhodnotit stav orgánů ponechaných po odběru chirurgem v těle in situ, a tudíž nevyužitých k transplantaci (Valente et al., 2006).

Ve své práci jsem se věnoval tkáňové diagnostice u dosud méně probádaných orgánových transplantací – u transplantace dělohy a plic.

1.2 Transplantace dělohy

Transplantace dělohy (UTx) představuje novou experimentální metodu léčby absolutního uterinního faktoru infertility (AUFI), který postihuje 3–5 % neplodných žen. Jedná se zejména o ženy se závažnými vrozenými či získanými chorobami dělohy a pacientky ve fertilním věku po hysterektomii (Brännström et al., 2018). UTx neslouží k záchraně života a zdraví (jako např. transplantace srdce, plic, jater či ledvin), ale patří do skupiny tzv. vaskulárně-kompozitních alotransplantací (jako např. transplantace obličeje a ruky), které jsou určené ke zvýšení kvality života a zkvalitnění sociální integrace jedinců do společnosti. UTx se však všem ostatním orgánovým transplantacím vymyká zejména tím, že jde o jedinou primárně plánovanou dočasnou transplantaci a užívání imunosupresivní terapie je proto nutné pouze do doby naplnění reprodukčních cílů příjemkyně. Poté je děložní štěp z těla vyjmut a antirejekční léčba může být ukončena. Možnost reprodukce biologicky vlastních potomků řadí UTx mezi metody asistované reprodukce, ale některými zastánci adopcí bývá označována i jako příliš náročná a relativně radikální forma lidské reprodukce (Lotz, 2018).

Dosud bylo ve světě provedeno více než 100 transplantací dělohy, díky nimž se ženám s AUFI narodilo přes 30 dětí (Richards et al., 2021). Recentně publikovaná analýza potvrdila vysokou míru (79 %) porodů v termínu nebo krátce před stádiem zralosti a zároveň neprokázala žádné závažnější zdravotní komplikace na straně matek ani dětí, které by nebylo možné vyléčit standardními gynekologicko-porodnickými a neonatologickými léčebnými postupy (Johannesson et al., 2021). Ačkoli UTx čelí řadě nezodpovězených etických otázek, je vnímána jako nadějná experimentální léčba AUFI, jejíž efektivita a bezpečnost by měla být potvrzena v dohledné době po ukončení studií probíhající v mnoha zemích světa. Role patologa spočívá zejména v hodnocení rejekčních změn uterinních alograftů. Evaluace rejekcí dělohy vychází z dosud platného provizorního skórovacího systému švédských autorů (Mölne et al., 2017), který však již ve svém názvu

odráží nezbytnost dalšího výzkumu a možnost jeho úpravy v budoucnu. Odborná publikační aktivita zabývající se patologickými aspekty léčby neplodnosti pomocí UTx je sice minimální, probíhající studie by ale mohly v dohledné době přinést nové výsledky.

Historie transplantace dělohy

První transplantace dělohy u člověka proběhla v roce 2000 v Saudské Arábii, kdy příjemkyně dělohy přijala štěp od nepříbuzné žijící dárkyně. Ačkoli samotný odběr i transplantace proběhly úspěšně, po třech měsících od operace byla zjištěna nekróza graftu kvůli dehiscenci utero-vaginální anastomózy a následnému prolapsu dělohy do pochvy s okluzí uterinních cév (Fageeh et al., 2002). V průběhu následujících dvou desetiletí od tohoto pokusu se z UTx vyvinula nadějná experimentální metoda léčby neplodnosti, která by se mohla po stádiu ověřování stát v budoucnu standardní léčebnou metodou (Brännström et al., 2014). V roce 2014 se ve Švédsku narodilo císařským řezem první dítě z dělohy transplantované od žijící dárkyně (Brännström et al., 2015). Na tento porod navazovaly další, přičemž některé z příjemkyň dělohy porodily dvě děti a až poté podstoupily hysterektomii (Dahm-Kähler et al., 2016). První dítě z dělohy kadaverózní dárkyně se narodilo v roce 2017 v Brazílii (Ejzenberg et al., 2019). Počátky uterinního transplantačního programu v České republice se datují do let 2014–2015, kdy proběhla studie s iniciální kohortou 50 českých pacientek s kongenitální agenezí dělohy a pochvy (syndromem Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser) a neovaginou vytvořenou technikou podle Vecchiettiho (Chmel et al., 2018). Z těchto zájemkyň o UTx se rekrutovala část pacientek, které se staly příjemkyněmi transplantované dělohy v České republice po roce 2016, přičemž pět žen obdrželo dělohu od žijících a pět od kadaverózních dárkyň. Celkem sedm případů UTx bylo funkčně úspěšných, všechny tyto ženy podstoupily embryotransfery v rámci asistované reprodukce a první porod zdravého dítěte po UTx proběhl v Praze v roce 2019 ve 35. gestačním týdnu (Chmel et al., 2020a, 2019).

Etické aspekty transplantace dělohy

UTx byla již od počátku spojena s řadou kontroverzí stran etických, medicínských, psychologických a náboženských aspektů. Zastánci této složité léčby neplodnosti ji obhajují jako de facto jedinou kauzální terapeutickou možnost, která ženám s AUFI zajistí jak geneticky, tak zejména biologicky, vlastního potomka (biologická matka je vždy ta, která dítě porodí). Ve srovnání s žijícími dárci ledvin a části jater obhájcové UTx rovněž zdůrazňují nižší riziko vzniku závažných komplikací u žijících dárkyň dělohy (Testa et al.,

2017). Navíc ve srovnání se surogátním těhotenstvím, které umožňuje zajistit neplodnému páru geneticky vlastní dítě cestou náhradní těhotné, je UTx spojena s eticky akceptovatelným přijetím všech rizik spojených s otěhotněním, graviditou a porodem samotnou příjemkyní dělohy. Kritici UTx na druhou stranu zdůrazňují zejména chirurgickou náročnost jak odběru děložního štěpu od žijící dárkyně, tak i samotné transplantace, ale upozorňují i na rizika vyplývající z užívání imunosuprese, a to za cenu „pouhého" zvýšení kvality života a nikoli za cenu jeho záchrany jako u jiných orgánových transplantací. Některé kontroverze mohou být spojeny i s dárcovstvím dělohy od zemřelých dárkyň. Souhrn aktuálních etických postojů k této experimentální metodě léčby AUFI byl recentně publikován i v české odborné literatuře (Chmel et al., 2021).

1.2.1 Tkáňová diagnostika dělohy příjemkyně

Jako u jiných orgánových transplantací, vyšetření explantátu příjemkyň v rámci UTx slouží především k potvrzení základního stavu, který primárně k nutnosti transplantace vedl – v tomto případě k AUFI.

Mezi nejčastější příčiny AUFI se řadí uterinní ageneze a jiné závažné malformace dělohy. V rámci českého UTx programu šlo o dominantní indikaci – uterinní graft obdržely pacientky s Mayerovým-Rokitanského-Küsterovým-Hauserovým syndromem (Chmel et al., 2020a, 2020b, 2018). Jedná se o vrozenou vývojovou vadu charakterizovanou poruchou vývoje derivátů Müllerianských duktů, v důsledku které dochází k uterinní agenezi a různě vyjádřené hypoplázii vagíny s její výslednou atrézií. Syndrom proto též bývá synonymicky nazývaný Müllerianskou aplázií (Folch et al., 2000). Ověření malformací patologem obecně spočívá zejména v makroskopickém posouzení (pokud je děloha přítomna) a nemá charakteristický mikroskopický obraz.

Kromě malformací patří mezi příčiny AUFI i získané choroby dělohy ovlivňující fertilitu. Mezi nejčastější patří intrauterinní adheze po zánětech či nešetrné kyretáži (Ashermanův syndrom) a leiomyomy deformující děložní dutinu. Další skupinu zahrnují pacientky ve fertilním věku po hysterektomii z jiných důvodů (Brännström et al., 2018). I získané příčiny AUFI představují většinou choroby snadno ověřitelné laparoskopicky, hysteroskopicky či prostřednictvím zobrazovacích metod. Bioptické vyšetření původní dělohy příjemkyně proto nabývá spíše podpůrného významu s výjimkou ověření uterinních leiomyomů, které však představují poměrně rutinní záležitost známou i v populaci netransplantovaných žen.

1.2.2 Tkáňová diagnostika dělohy dárkyně

Podobně jako v případě jiných orgánových transplantací je role patologa v rámci UTx nezastupitelná zejména v hodnocení hrozících známek rejekce v transplantované děloze. Podmínkou kvalitní histopatologické diagnostiky je gynekologem technicky správně provedená biopsie z děložního hrdla transplantované dělohy. Ideálně pod kolposkopickou kontrolou místa optimálního odběru, tj. z ektocervixu, což může být problémem zejména v případě potransplantační stenózy utero-vaginální anastomózy, která způsobuje horší viditelnost ektocervixu nacházejícího se nad stenózou (Chmel et al., 2020b). Biopsie odebíraná z ektocervixu děložního hrdla je sice pro pacientku nekomfortní, ale díky přerušené inervaci dělohy při jejím odběru od dárkyně fakticky nebolestivá. Stále není zcela jisté, zda zánětlivé změny v ektocervixu korelují s eventuálními zánětlivými (rejekčními) změnami ve zbytku dělohy, nicméně nedávná švédská studie sedmi explantovaných dělohy po transplantaci naznačila reprezentativnost ektocervikálních odběrů pro celou dělohu (Broecker et al., 2021). Kontrolní bioptický odběr se opakuje v pravidelných intervalech po transplantaci, před otěhotněním, ale i v průběhu gravidity (Brännström et al., 2015, 2014; Brucker et al., 2020; Chmel et al., 2019; Ejzenberg et al., 2019). Pokud je rejekce histopatologicky potvrzena, provádí se po podání či úpravě udržovací imunosupresivní antirejekční léčby opakovaná biopsie k vyloučení perzistujících známek rejekce. Opakování biopsie může oddálit následující embryotransfery čekáním na zhojení místa odběru tkáně z ektocervixu a zároveň i prodlužovat dobu užívání imunosupresiv. Stanovení stupně rejekce je založeno na provizorním skórovacím systému švédských autorů, které hodnotí zánětlivý infiltrát v ektocervixu (Mölne et al., 2017). Tato klasifikace dělí histopatologické (subklinické) rejekční změny na mírné (grade 1), střední (grade 2) a těžké (grade 3), přičemž zároveň zavádí i kategorii tzv. hraničních (borderline) změn a kategorii grade 0, známou z kontroly známek rejekce u jiných orgánových transplantací.

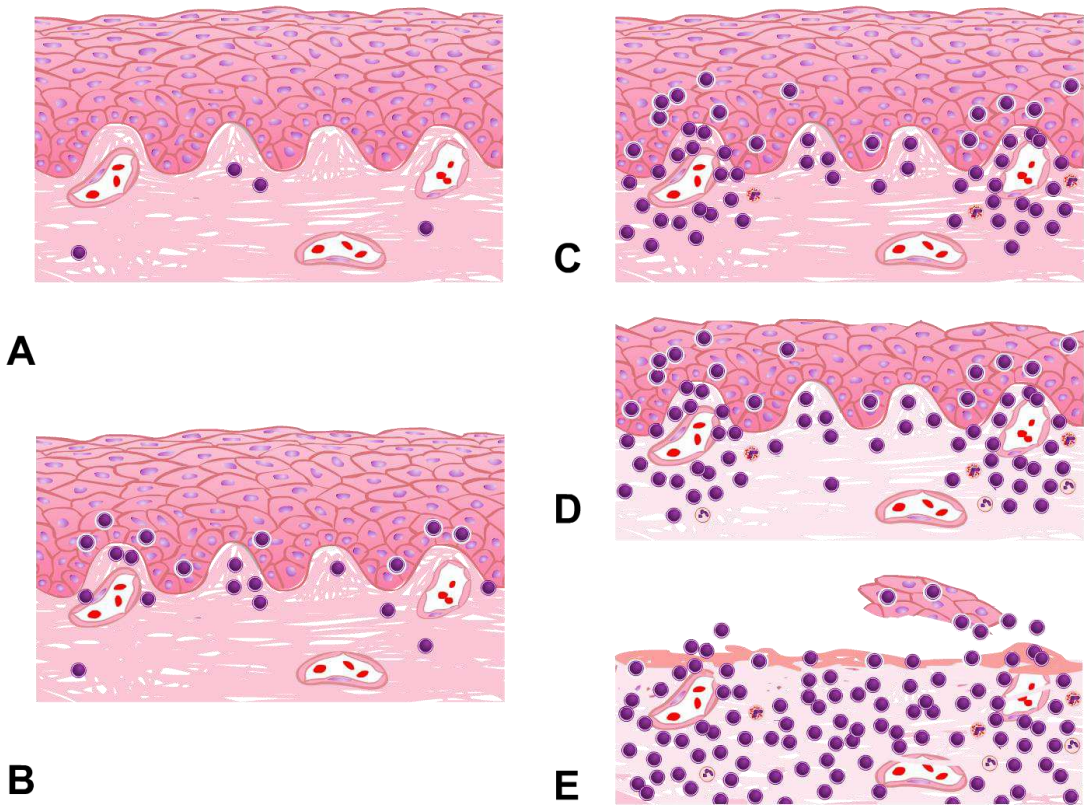
1.2.2.1 Diagnostika rejekce v rámci UTx

Rejekční změny uterinních graftů jsou definovány na základě provizorního skórovacího systému rejekčních změn po transplantaci dělohy. V rámci současně platné klasifikace morfologie rejekčních změn se rozpoznávají 4 kategorie (Mölne et al., 2017), které jsou definovány následujícími rysy, graficky znázorněnými na přiloženém schématu (obr. 1): *Grade 0* značí absenci rejekce (normální nález). *Grade 1* (mírná rejekce) je charakterizován mírným smíšeným zánětlivým infiltrátem s dominancí lymfocytů, které se nacházejí zejména na epitelo-stromální junkci ektocervixu (v oblasti superficiálního stromatu a

stratum basale dlaždicového epitelu). Zánětlivá infiltrace bývá ložisková a epitel nevykazuje regresivní změny s výjimkou ojedinělých apoptóz keratinocytů. *Grade 2* (střední stupeň rejekce) obsahuje v oblasti epitelo-stromální junkce středně intenzivní smíšený zánět s vyjádřeným intraepiteliálním influxem leukocytů a edémem stromatu. Kromě převažujících lymfocytů lze pozorovat účast četnějších neutrofilních granulocytů. Dlaždicový epitel může být fokálně ztenčený, edematózně prosáklý a obsahovat disperzní apoptotická tělíska. *Grade 3* (těžkou rejekci) definuje přítomnost nápadného difuzního smíšeného zánětlivého infiltrátu s převahou lymfocytů a účastí hojných neutrofilních a eozinofilních granulocytů. V dlaždicovém epitelu lze kromě apoptotických tělísek po zaniklých keratinocytech pozorovat eroze až ulcerace s nekrotizací výstelky i přilehlého stromatu.

Provizorní skórovací systém děložních alograftů dále uvádí *kategorii tzv. hraničních (borderline) změn*. Tu představují minimálně dva malé nesplývající aglomeráty lymfocytů, jež lze nalézt zejména v epitelo-stromální junkci. V epitelu je může doprovázet intercelulární edém; v intersticiu se nachází převážně ve stromálních papilách. Význam těchto aglomerátů ve vztahu k rejekci je zatím nejistý, přítomnost podobných „pseudorejekčních“ změn byla totiž v nedávné studii prokázána i u zdravých žen s vlastní dělohou (Agarwal et al., 2022). *Grade X* značí nereprezentativní vzorek. Prozatímní klasifikace hodnotila pouze akutní celulární rejekční změny; pro humorální i chronickou rejekci dělohy stále chybí spolehlivá data. Dosud bylo publikováno jen několik případů popisujících výskyt protrahované smíšené celulární a suspektní humorální rejekce u pacientek s uterinním alograftem (Agarwal et al., 2022; Flyckt et al., 2020).

Recentní studie dále navrhují kromě uvedených histopatologických znaků uterinní rejekce hodnotit i další morfologické rysy, zejména perivaskulární zánětlivé změny a defekty kapilár s následným krvácením do intersticia (Agarwal et al., 2022; Kudose et al., 2022). Tyto charakteristiky však byly popsány až po provedení naší studie a čekají na uvedení do praxe.



Obr. 1. Schéma provizorního skórovacího systému rejekčních změn po UTx. **A:** *Grade 0*, tj. normální cervikální biopsie s izolovanými zánětlivými buňkami. **B:** *Borderline změny* definované shlukujícími se zánětlivými buňkami s převahou lymfocytů v oblasti epitelo-stromální junkce s intraepiteliálním influxem leukocytů. **C:** *Grade 1* (mírná) rejekce charakterizovaná ložiskovým smíšeným zánětlivým infiltrátem s převahou lymfocytů v oblasti epitelo-stromální junkce. **D:** *Grade 2* (střední) rejekce charakterizovaná ložiskovým až splývajícím smíšeným zánětlivým infiltrátem s převahou lymfocytů v oblasti epitelo-stromální junkce, doprovázená redukcí šíře epitelu a stromálním edémem. **E:** *Grade 3* (těžká) rejekce s nápadným difuzním smíšeným zánětlivým infiltrátem. Epiteliální eroze/ulcerace mohou být přítomny.

1.3 Transplantace plic

Transplantace plic (LTx) představuje život zachraňující a zároveň výrazně život zkvalitňující terapeutickou metodu, která je indikována jako poslední možnost v případě terminálních stádií variabilních chronických plicních onemocnění. Jedná se o stavy, u kterých byly vyčerpány možnosti konzervativní terapie a je očekávána snížená doba přežití pacienta. Avšak ne kratší, než předpokládaný čas strávený na čekací listině („waiting list"; průměrně 12–18 měsíců) (Chadimová et al., 2015). Tito pacienti mají prakticky chybějící kvalitu života – zpravidla jsou imobilní a odkázaní na kyslíkovou podporu. Snad právě z důvodů vitální indikace a výrazného zkvalitnění života není v souvislosti s LTx tolik

skloňována etická stránka této léčebné metody, obzvláště v porovnání s výše uvedenou transplantací dělohy.

Podmínkou zařazení do transplantačního plicního programu je kromě splnění indikačních kritérií zároveň i nesplnění řady kontraindikací. Ve zkratce lze kontraindikace rozdělit na absolutní a relativní. Mezi absolutní kontraindikace se řadí anamnéza malignity v minulých pěti letech (s výjimkou kožních karcinomů), terminální stádia onemocnění jiných orgánů (zejména mozku, srdce, ledvin a jater), sepse, pokročilá ischemická choroba srdeční, aktivní tuberkulóza, krvácivé choroby, non-compliance pacienta, neléčitelné psychiatrické onemocnění (schizofrenie apod.), deformity hrudníku či páteře, absence sociálního zázemí a závislosti na návykových látkách (alkohol, drogy a v souvislosti s plícemi zejména kouření). V případě výskytu některé z absolutních kontraindikací je LTx zpravidla automaticky zamítnuta. Jiný postup je aplikován u relativních kontraindikací. Pokud se některá z nich vyskytne, je na rozhodnutí transplantačního týmu, zda bude LTx provedena. Mezi tyto stavy se řadí věk pacienta nad 65 let, kritické/klinicky nestabilní funkční stavy, kolonizace vysoce virulentními/multirezistentními kmeny mikroorganizmů a chronické infekce typu HIV či chronických virových hepatitid B i C (v minulosti představující absolutní kontraindikace), předchozí resekce plic a řada jiných chorob v pokročilém stádiu (systémová onemocnění, obezita, malnutrice, progresivní neuromuskulární poruchy, osteoporóza, diabetes mellitus, arteriální hypertenze atd.) (Weill, 2018).

Stran dárce je také třeba splnit některé podmínky, aby mohly být darované plíce využity jako štěp. Obecně by měly mít zachovány respirační funkce a dále také velikostně odpovídat hrudníku příjemce. Mezí základní kritéria zajišťující zachovanou schopnost respirace patří absence plicních infekcí, anamnézy dlouhodobé ventilace či traumat hrudníku. Dále je vyžadováno splnění určité imunologické kompatibility – konkrétně shody v AB0 systému krevních skupin dárce a příjemce a negativní cross-match test/panel reaktivních protilátek, tj. negativní předoperační screening na přítomnost donor-specifických protilátek (DSA) proti HLA (human leukocyte antigen) dárce. Tyto protilátky mohou být v séru příjemce preformovány po předchozí transfuzi, těhotenství či re-transplantaci. DSA vytvořené de novo po LTx zvyšují riziko vzniku většiny typů rejekcí (Hachem, 2011; Morrell et al., 2014; Sundaresan et al., 1998). Typizace HLA se u LTx neprovádí, výhodnější je ovšem jejich co největší podobnost (teoreticky dosažitelná např. v rámci izotransplantace mezi jednovaječnými dvojčaty; avšak ani zde nejde vlivem genetických polymorfizmů najít

absolutní shodu). Ve výsledku lze akceptovat cca jen 15–20 % dárců, což představuje hlavní limitaci v provádění LTx v České republice navzdory zdejšímu předpokládanému souhlasu s darováním orgánů po smrti (Chadimová et al., 2015).

I přes pečlivý výběr vhodných dárců i příjemců a rozvoj chirurgických technik mají pacienti po LTx v porovnání s jinými typy orgánových transplantací nejnižší dobu přežití (v průměru šest let) (Chambers et al., 2017). Vliv na to má anatomické uspořádání plic, které – na rozdíl od jiných transplantovaných orgánů – přichází s každým vdechem a výdechem do kontaktu se zevním prostředím, což v terénu posttransplantační imunosuprese usnadňuje vznik infekcí (Martinu et al., 2009). Také dosud ne zcela objasněné mechanizmy vedoucí k chronické rejekci jsou odpovědné za sníženou dobu přežití LTx pacientů, zejména v pozdějším období, tj. jeden rok po LTx a dále (Parulekar and Kao, 2019). Tyto faktory představují výzvy pro budoucí výzkum v oblasti LTx a zároveň odráží komplikovanou cestu, která k současnému rozvoji LTx historicky vedla.

Historie transplantace plic

První transplantace plíce u člověka proběhla v roce 1963 v USA (Hardy et al., 1963; Venuta and van Raemdonck, 2017). Jednalo se o jednostrannou plicní transplantaci (SLTx), po které pacient přežil cca dva týdny. Úspěšně zopakovat podobný zákrok se podařilo až o dvě desetiletí později v Kanadě, kdy byla opět provedena SLTx. Po dalších třech letech následovalo provedení dnes již běžněji využívané oboustranné plicní transplantace (DLTx) (Toronto Lung Transplant Group, 1986). Chirurgický postup byl dále zdokonalen přechodem z en-block metody s tracheální anastomózou na dodnes používanou metodu tzv. sekvenční transplantace obou plicních křídel. Dalším milníkem v LTx byl přenos plic od dárce s nebijícím srdcem v roce 2001 (Steen et al., 2001), zejména proto, že v současné době pochází většina štěpů od zemřelých dárců. Počátky plicního transplantačního programu v České republice se datují do roku 1997, kdy byla na 3. chirurgické klinice 1. LF UK a FN Motol v Praze provedena první SLTx u pacienta s hypersenzitivní pneumonií (Lischke et al., 2011), následovaná o rok později úspěšnou DLTx u pacientky s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) (Pafko et al., 1999). Uvedené pracoviště dnes patří mezi velkoobjemová centra, které kromě České republiky poskytuje LTx i slovenským pacientům. Za rok 2021 zde byly transplantovány plíce 52 pacientům, čímž český plicní transplantační program nezaostává ani na světové poměry.

1.3.1 Tkáňová diagnostika plic příjemce

Oproti výše zmíněnému bioptickému vyšetření explantátů děloh, které v UTx hraje spíše okrajovou roli, je tkáňová diagnostika explantovaných plic příjemce v rámci LTx mnohem komplikovanější a relativně často přináší nečekané nálezy. Kromě ověření diagnózy základní choroby totiž pomáhá upřesnit její rozsah a detekovat neozřejměné vedlejší nálezy (např. floridní zánětlivé změny v plicním parenchymu, reaktivaci tuberkulózních ložisek (Bravo et al., 2005) či vzácně i nerozpoznané nádorové léze). Řada těchto lézí by při dřívějším rozpoznání zpravidla znamenala kontraindikaci LTx (Razia et al., 2022). Podstatou vyšetření explantovaných plic však zůstává potvrzení základní plicní choroby, která byla indikací k LTx.

Nejčastějšími indikacemi k LTx jsou chronické plicní choroby v terminálním stádiu, které mohou být rozděleny do několika kategorií na základě dominantního klinického nálezu. První kategorii představují zástupci obstrukčních poruch – zejména CHOPN i jiné příčiny emfyzematózního postižení plic (deficit α-1-antitrypsinu) a plicní postižení v rámci cystické fibrózy (CF) (Chadimová et al., 2015). Časté jsou též choroby z heterogenní skupiny restrikčních plicních nemocí. Z nejběžnějších je určitě nutné uvést hypersenzitivní pneumonii/exogenní alergickou alveolitidu (EAA), idiopatickou plicní fibrózu (IPF), nespecifickou intersticiální pneumonii (NSIP), kryptogenní organizující pneumonii (COP), pleuroparenchymální fibroelastózu (PPFE), kombinovaný syndrom plicní fibrózy a emfyzému (CPFE), sarkoidózu, lymfangioleiomyomatózu, plicní histiocytózu z Langerhansových buněk a dále sekundární plicní postižení v rámci systémových onemocnění (revmatoidní artritida, systémový lupus erythematodes, sklerodermie atd.) a polékových postižení. Třetí skupinu představují choroby charakterizované dominantním postižením plicních cév. Jedná se hlavně o primární/idiopatickou plicní arteriální hypertenzi (IPAH), plicní veno-okluzivní nemoc (VON) a vzácně i plicní kapilární hemangiomatózu (PKH). Zvláštní kategorii představují retransplantované plíce z důvodů některého z typů chronické rejekce (CLAD, chronic lung allograft dysfunction) – bronchiolitis obliterans a RAS (restrictive allograft syndrome – název dosud nemá český ekvivalent)

Řada těchto plicních nemocí (např. restrikční plicní choroby) nemusí být snadno diagnostikovatelná pomocí klinických a zobrazovacích metod a vyžaduje histopatologickou analýzu, která před resekcí plíce bývá možná pouze prostřednictvím limitovaného odběru (transbronchiální biopsií či kryobiopsií) a tudíž s omezenou výpovědní hodnotou. Plicní

explantát po LTx tedy představuje cenný materiál s bohatým množstvím tkáně, která může být vyšetřena k přesnějšímu stanovení diagnózy. Na druhou stranu nutno zmínit, že vzhledem k často terminálnímu stavu daných plicních onemocnění (např. „voštinovité plíce“ v rámci restrikčních plicních chorob) může být poměrně obtížné konkrétní jednotky v pozdním stádiu jednoznačně subklasifikovat. Většina zmíněných plicních postižení je idiopatického původu s nejistou etiopatogenezí a množství patologicky změněné tkáně získané resekcí po LTx je nedoceněným materiálem k výzkumným účelům, které by mohly pomoci ozřejmit obecnou podstatu těchto poruch.

1.3.2 Tkáňová diagnostika plic dárce

V současnosti je v LTx programu také velkou výzvou zvládnutí rejekčních poškození štěpu, které představují hlavní komplikace této metody (Parulekar and Kao, 2019). K jejich diagnostice je zpravidla nutný bioptický odběr štěpu, z nějž patologové určují rejekci. Biopsie transplantovaných plic se rozdělují na protokolární (standardně nabírané v určitých časových intervalech po LTx; např. po jednom, třech a šesti měsících a dále po prvním roce) a tzv. akutní, odebírané v případě subklinického poklesu hodnot ve spirometrickém vyšetření pacienta, nebo při případné manifestaci klinických příznaků (Chadimová et al., 2015). Symptomy rejekce jsou samy o sobě nespecifické (dušnost, suchý až produktivní kašel, subfebrilie) a bioptické ověření je tudíž nutné i u klinicky manifestních případů (Parulekar and Kao, 2019). Přítomnost příznaků bývá současně spojená s vyšším stupněm rejekčních změn (de Vito Dabbs et al., 2004). Nutnost odhalit a léčit i asymptomatickou rejekci vyplývá také z rizika vzniku chronické rejekce (Hachem et al., 2005; Hopkins et al., 2004; Husain et al., 1999) s hrozícím selháním štěpu a následným úmrtím pacienta v důsledku postupného poškození plicního parenchymu alogenní reakcí v kombinaci s neimunitními mechanizmy.

V patogenezi rejekce mohou dominovat celulární nebo humorální složky imunity. V případě buněčné imunitní odpovědi rejekce prakticky odpovídá vzniku lymfo(plazmo)cytárního (nehnisavého) zánětu. Proto se pacientům po LTx nasazuje imunosupresivní terapie k optimalizaci jejich posttransplantačního přežívání. V rámci současné minimalizace infekčních komplikací imunosuprese se LTx pacientům ve spolupráci s mikrobiology zároveň nasazuje i anti-infekční profylaxe. Imunosupresivní strategie spočívá v indukční a udržovací léčbě a v případě potřeby i v terapii (sub)klinicky manifestované rejekce. Indukce imunosuprese zahrnuje podání antilymfocytárních

protilátek nebo monoklonálních protilátek proti receptoru interleukinu-2. Udržovací dávky imunosupresiv pak představují kombinaci inhibitoru kalcineurinového receptoru (cyklosporin A) a kortikosteroidů (Witt et al., 2014). Variantou cyklosporinu může být takrolimus, který dokáže kromě epizod akutní rejekce snížit i četnost výskytu bronchiolitis obliterans (Treede et al., 2012). I přes dané protokoly může rejekce vzniknout kdykoli v posttransplantačním období pacientova života a podle rychlosti svého vývinu se dělí na hyperakutní, akutní a chronickou formu.

Hyperakutní rejekce je v porovnání s jinými orgánovými transplantacemi u LTx vzácná (de Jesus Peixoto Camargo et al., 2008), čemuž napomáhá její prevence prostřednictvím rutinně prováděného cross-match testu příjemců. Naopak velmi častý je výskyt některého z typů akutní celulární rejekce (ACR) – až 28 % příjemců plic vyvine alespoň jednu terapii vyžadující epizodu ACR během prvního roku po transplantaci (Chambers et al., 2017). Vedle celulární formy existuje i humorální rejekce (AMR, antibody mediated rejection), jež ale zatím není příliš probádána (Roux et al., 2019). ACR i AMR představují hlavní riziko pro rozvoj některé formy chronické rejekce, která je hlavním faktorem zabraňujícím dlouhodobému přežívání pacientů s LTx a která se objevuje v období od jednoho roku po transplantaci a dále (Parulekar and Kao, 2019). Termín chronická rejekce/CLAD zastřešuje různé typy chronického poškození graftu: bronchiolitis obliterans syndrom (BOS), jež odpovídá obstrukční formě, a RAS, představující restrikční typ s horší prognózou. Kromě těchto dvou základních forem CLAD se nově rozpoznávají i jejich smíšená a blíže neurčitelná forma (Glanville et al., 2019; Verleden et al., 2019).

Z uvedených typů rejekcí představuje diagnostickou výzvu zejména AMR a RAS, jež dosud nemají zcela spolehlivě stanovená morfologická kritéria, která by mohla být využita k jejich jednoznačnému stanovení histopatologickým vyšetřením. Obě tyto jednotky tudíž ke svému potvrzení vyžadují multidisciplinární přístup s korelací klinických, zobrazovacích a histopatologických vyšetření. ACR a BOS však dokáže patolog poměrně snadno určit díky dobře definovaným histopatologickým diagnostickým kritériím a odpovídajícímu systému gradingu (Parulekar and Kao, 2019; Stewart et al., 2007).

1.3.2.1 Diagnostika hyperakutní rejekce v rámci LTx

Hyperakutní rejekce plic byla díky zavedení rutinně prováděného cross-match testu prakticky vymýcena. Avšak pokud se vyskytne, je třeba jí prokázat pomocí diagnostických

kritérií převzatých z morfologického nálezu u jiných orgánových transplantací (ledviny, játra, srdce) (de Jesus Peixoto Camargo et al., 2008; Frost et al., 1996). Stanovení daných kritérií vyžaduje multidisciplinární spolupráci, a kromě klinického obrazu zahrnuje průkaz DSA v séru příjemce i graftu (imunofluorescenční průkaz jejich vazby na epitel i endotel) a histopatologické známky difuzního poškození štěpu. V případě LTx se jedná o obraz difuzního alveolárního poškození – diffuse alveolar damage (DAD) s neutrofilními infiltráty a destičkovými tromby v kapilárách.

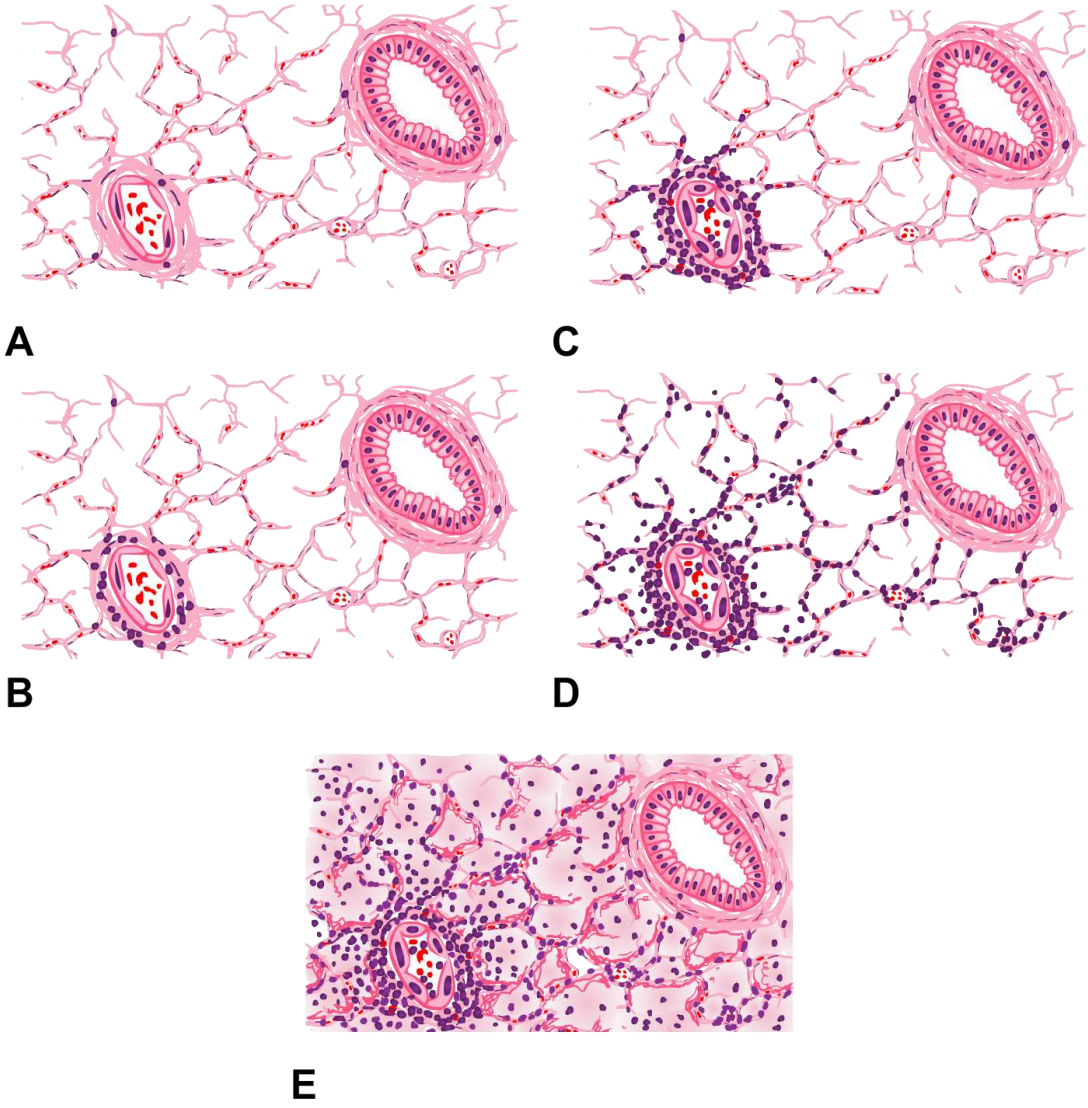
1.3.2.2 Diagnostika akutní (celulární) rejekce v rámci LTx

První standardizované klasifikační schéma rejekčních změn stanovila International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) v roce 1990 s následnou revizí mezinárodní skupinou transplantačních patologů v roce 1995 (Yousem et al., 1996). Další revize se odehrála v roce 2006 pod vedením ISHLT a je platná dodnes (Stewart et al., 2007). Standardizace morfologických nálezů je důležitá pro následující strategii terapie a spolupráci mezinárodních transplantačních týmů. Plicní tkáně k danému vyšetření lze získat bronchoskopicky prostřednictvím transbronchiální biopsie s náběrem min. pěti částek parenchymu (Parulekar and Kao, 2019; Stewart et al., 2007), nebo metodou kryobiopsie, která i při odběru jednoho vzorku poskytuje bohatější materiál s vyšší mírou zachycení bronchiolů (Švorcová et al., 2022).

V současné klasifikaci je diagnóza ACR založena na přítomnosti rejekčních infiltrátů, tj. perivaskulárních až intersticiálních mono(morfo)nukleárních leukocytů, zejména lymfocytů (Parulekar and Kao, 2019; Stewart et al., 2007). S rostoucím stupněm rejekce stoupá poměr cytotoxických T-lymfocytů (CD8 pozitivních) vůči helperům (CD4 pozitivním) (de Blic et al., 1992). Kromě antigen stimulovaných T-lymfocytů se na rejekčním infiltrátu v případě vyšších stupňů rejekce dále podílí i makrofágy a eozinofilní či neutrofilní granulocyty. Akutní rejekční infiltráty se podle své lokalizace dělí na dvě základní kategorie (Parulekar and Kao, 2019; Stewart et al., 2007): Grade A sloužící k posouzení perivaskulárních až intersticiálních a případně intraalveolárních rejekčních infiltrátů, a grade B umožňující zhodnotit rejekční změny peribrochiolárně v rámci tzv. lymfocytární bronchiolitidy.

Grade A je dále subklasifikován do pěti stupňů (Parulekar and Kao, 2019; Stewart et al., 2007), které jsou definovány následujícími rysy a graficky znázorněny na přiloženém schématu (obr. 2): *Grade A0* značí absenci perivaskulárních rejekčních změn (normální

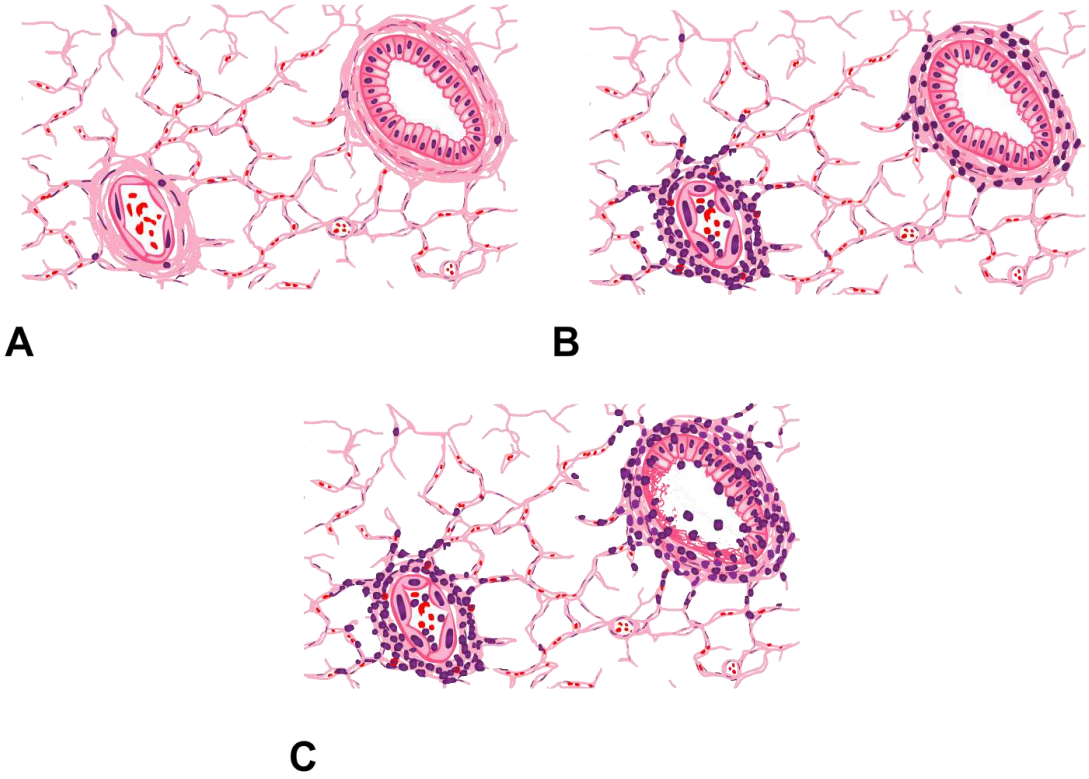
nález). *Grade A1* (minimální rejekce) je charakterizován rozptýlenými lymfocytárními infiltráty perivaskulárně (zejména kolem venul) do maximální šíře dvou až tří vrstev buněk, bez známek endotelitidy a bez účasti eozinofilních granulocytů. *Grade A2* (mírná rejekce) odpovídá nálezu četnějších perivaskulárních rejekčních infiltrátů rozpoznatelných i na malé zvětšení objektivu (4x) a tvořených kromě lymfocytů i příměsí makrofágů a eozinofilních granulocytů. V rámci mírné rejekce již může být zastižena endotelitida, což označuje přítomnost zduřelých endotelií malých a středních cév (zejména venul) s adhezí intravaskulárních lymfocytů. *Grade A3* (střední rejekce) je definována výskytem hustých perivaskulárních rejekčních infiltrátů s šířením do intersticia včetně interalveolárních sept a ojedinělým průnikem do alveolů. V zánětlivých infiltrátech lze identifikovat lymfocyty, makrofágy, eozinofilní a disperzně i neutrofilní granulocyty. Střední rejekce je běžně asociována s endotelitidou. Vzácně se vyskytující *grade A4* (těžká rejekce) se vyznačuje difuzními rejekčními infiltráty perivaskulárně až intersticiálně, včetně výskytu v interalveolárních septech a hojným intraalveolárním průnikem. Vyjádřena je vždy endotelitida až nekrotizující vaskulitida a regresivní změny až nekrotizace pneumocytů, včetně přítomnosti hyalinních blanek, čímž obraz může nabývat charakteru nerozpoznatelného od akutní fáze DAD. *Grade AX* značí nereprezentativní vzorek bez přítomnosti struktur plicního parenchymu a cév malého kalibru (venuly, arterioly).



Obr. 2. Schéma klasifikace a gradingu A ACR plic. **A:** *Grade A0*, tj. normální plicní parenchym s izolovanými zánětlivými buňkami. **B:** *Grade A1* (minimální) rejekce s rozptýlenými perivaskulárními lymfocytárními infiltráty. **C:** *Grade A2* (mírná) rejekce charakterizovaná četnějšími perivaskulárními smíšenými zánětlivými infiltráty patrnými i na malé zvětšení a možnou endotelitidou. **D:** *Grade A3* (střední) rejekce s obrazem hustých perivaskulárních smíšených infiltrátů šířících se do intersticia včetně interalveolárních sept. Endotelitida je prakticky pravidlem. **E:** *Grade A4* (těžká) rejekce vykazuje až obraz DAD s difuzními smíšenými zánětlivými infiltráty pronikajícími i intraalveolárně, kde dochází k nekróze pneumocytů. Endotelitida může přejít do nekrotizující vaskulitidy.

Grade B (lymfocytární bronchiolitida) zpravidla doprovází grade A rejekci minimálně stejné závažnosti a představuje peribronchiolární zánětlivé změny, u kterých není identifikována non-rejekční příčina (např. infekce) a které jsou dále subklasifikovány do tří stupňů (Parulekar and Kao, 2019; Stewart et al., 2007). Ty jsou definovány následujícími rysy a graficky znázorněny na přiloženém schématu (obr. 3): *Grade B0* značí absenci

peribronchiolárních rejekčních změn (normální nález). *Grade B1R* (low grade akutní rejekční bronchiolitida) je charakterizován přítomností peribronchiolární zánětlivé celulizace bez intraepiteliálního influxu lymfocytů a bez regresivních změn bronchiolárního epitelu. *Grade B2R* (high grade akutní rejekční bronchiolitida) obsahuje hustý peribronchiolární rejekční infiltrát s intraepiteliálním průnikem lymfocytů a regresivními změnami epitelu bronchiolů (dlaždicobuněčná metaplázie až nekróza a ulcerace). *Grade BX* značí nereprezentativní vzorek bez zastižení bronchiolů.



Obr. 3. Schéma klasifikace a gradingu B ACR plic. **A:** *Grade B0*, tj. nález normálních bronchiolů bez zánětlivé celulizace. **B:** *Grade B1R* (low grade akutní rejekční bronchiolitida) s peribronchiolárními lymfocytárními infiltráty bez regresivních změn výstelky bronchiolu. Grade B zpravidla doprovází známky akutní celulární rejekce typu A. **C:** *Grade B2R* (high grade akutní rejekční bronchiolitida) charakterizovaná hustým peribronchiolárním zánětem s intraepiteliálním průnikem leukocytů a následnými regresivními změnami bronchiolárního epitelu.

1.3.2.3 Diagnostika chronické rejekce v rámci LTx

Chronická rejekce plic vzniká nejdříve po třech měsících (většinou však až po prvním roce) od LTx a podílí se na ní imunitní i neimunitní mechanizmy (Verleden et al., 2019). Z imunitních pochodů jde především o opakované epizody ACR (Parulekar and Kao, 2019)

a z neimunitních faktorů hraje roli opotřebení štěpu (vliv denervace se ztrátou kašlacího reflexu, nefunkční lymfatické drenáže s postupnou fibrotizací intersticia atd.).

Tradičně se chronická rejekce plic dělila na grade C (bronchiolitis obliterans) a grade D (vaskulární rejekce) (Stewart et al., 2007). *Grade C* určuje přítomnost (C1), či nepřítomnost (C0) obliterující bronchiolitidy, tj. intrabronchiolárních zátkovitých proliferací vaziva, vedoucích ke stenóze až úplné obliteraci bronchiolárních lumen. V důsledku čehož se vyvíjí těžké ireverzibilní obstrukční porušení plicních funkcí, vedoucí zpravidla ke smrti pacienta. Ačkoli má bronchiolitis obliterans jasně stanovená morfologická kritéria, bývá v biopsiích zastižena spíše výjimečně a diagnostika je založená na základě trvalého poklesu plicních funkcí s vyloučením jiných příčin (ACR, gastroezofageální reflux, stenóza bronchiálních anastomóz, infekce atd.) (Verleden et al., 2019). *Grade D* zahrnuje akceleraci chronické arteriální a venózní sklerózy s fibrointimální fibrotizací a následnou stenotizací lumen, kterou však nelze diagnostikovat na základě samotné transbronchiální biopsie.

Nově se chronická rejekce označuje jako *CLAD* a je definována jako významný trvalý pokles plicních funkcí po LTx (konkrétně pokles $FEV_1 \geq 20$ % od referenční hodnoty a trvající nad 3 měsíce s vyloučením non-rejekčních příčin). Podle různě těžkého poklesu FEV_1 lze CLAD klinicky subklasifikovat na stage 1–4. Termín CLAD přitom zastřešuje dva odlišné fenotypy, které by se měly blíže specifikovat – BOS (klinická manifestace výše popsané morfologické jednotky bronchiolitis obliterans) a RAS. Případně na jejich smíšenou a blíže neurčenou formu (Glanville et al., 2019; Verleden et al., 2019). Obstrukční charakter BOS je vedle poklesu FEV_1 dále určen poměrem $FEV_1/FVC < 0{,}7$. RAS představuje restrikční formu chronické rejekce s trvalým poklesem plicních funkcí (vedle FEV_1 je nutný i pokles TLC $\geq$ 10 %) na podkladě pleurálních změn a intersticiální fibrotizace, která bývá patrná na CT jako tzv. „opacity mléčného skla“ (Verleden et al., 2019). Z uvedeného vyplývá, že k diagnóze CLAD je v současnosti nutná multidisciplinární spolupráce s korelací klinických dat a využitím spirometrie, zobrazovacích metod (RTG, CT) a často i celotělové pletysmografie (Verleden et al., 2019). Histopatologická evaluace může stanovit diagnózu BOS pouze v případech se zastiženým postižením bronchiolu v odebraném materiálu, jak je popsáno výše. Oproti tomu RAS dosud nemá dokonce žádná jednoznačně stanovená morfologická kritéria, která by dokázala jeho diagnózu určit pouze na základě biopsie bez spolupráce dalších metod. Histopatologickými znaky RAS

uváděnými v literatuře jsou převážně subpleurální fibroelastóza a obraz chronické/proliferativní fáze DAD (Glanville et al., 2019; Ofek et al., 2013).

1.3.2.4 Diagnostika humorální rejekce v rámci LTx

V rámci revize klasifikace ACR byla také vyvinuta snaha o stanovení morfologických kritérií AMR, využitelných v diagnostice tohoto procesu (Stewart et al., 2007). Avšak ani přes dané úsilí není dodnes možné AMR stanovit pouze na základě bioptického vyšetření plicního parenchymu (Roux et al., 2019). Diagnóza AMR představuje výsledek korelace klinických a laboratorních metod – opírá se o serologický průkaz DSA v séru příjemce, histopatologický nález kapilaritidy v bioptickém vzorku štěpu, imunofluorescenční/imunohistochemický průkaz vazby C4d složky komplementu na endotelie kapilár štěpu a vyloučení infekce. Hodnotí se také případné klinické zhoršení plicních funkcí (Parulekar and Kao, 2019). Žádný ze zmíněných znaků však izolovaně ke stanovení diagnózy nestačí (Haas et al., 2014; Hachem, 2012; Lefaucheur et al., 2009; Salvadori and Bertoni, 2014). Prací patologa je ozřejmění dvou z uvedených kritérií – identifikace kapilaritidy (obraz marginalizace až adheze neutrofilních granulocytů na aktivovaný endotel plicních kapilár s možným vznikem DAD) a vyšetření vazby C4d složky komplementu na endotelie v kapilárách graftu.

ISHLT dále AMR klasifikuje podle přítomnosti měřitelné dysfunkce štěpu na klinickou a subklinickou. Tyto podtypy potom dělí na základě počtu splněných diagnostických kritérií na definitivní (splňují-li všechna kritéria), pravděpodobné (chybí-li jedno kritérium) a možné (chybí-li dvě kritéria) (Levine et al., 2016). Přesná incidence, patogeneze, standardizovaná terapie ani chování plicní AMR není dosud zcela známé vzhledem k čerstvosti revidovaných diagnostických kritérií (Parulekar and Kao, 2019).

2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Tkáňová diagnostika transplantovaných orgánů příjemce i dárce je nedílnou součástí prakticky každého transplantačního programu. Zejména bioptická evaluace darovaného orgánu je zcela zásadní vzhledem k nemožnosti stanovit diagnózu rejekce jiným způsobem než histopatologicky. Výsledek tohoto vyšetření určuje managment a terapii transplantovaného pacienta. V případech, kdy není možné zcela jistě klinicky a radiologicky ověřit základní diagnózu vedoucí k nutnosti transplantace, je rovněž důležité bioptické zhodnocení explantovaného orgánu příjemce. Předkládaná práce je zaměřena na méně probádané oblasti tkáňové diagnostiky výše popsaných orgánových transplantací: transplantace dělohy – UTx (stran orgánu dárce) a transplantace plic – LTx (stran orgánu příjemce).

2.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh

Protože UTx představuje relativně novou metodu, je současný skórovací systém rejekčních změn provizorní a zahrnuje zvláštní kategorii tzv. borderline změn, u níž dodnes není zcela jisté, zda představuje skutečné rejekční změny, či fyziologický nález.

2.1.1 Hypotéza

Histopatologický a imunohistochemický nález lymfocytárních infiltrátů v ektocervixu netransplantovaných (vlastních) děloh premenopauzálních žen, operovaných z důvodů nesouvisejících s děložním hrdlem, se bude lišit od morfologického obrazu rejekce a borderline kategorie provizorního skórovacího systému rejekčních změn po transplantaci dělohy.

2.1.2 Cíle práce

Cílem Experimentu 1 bylo:

- charakterizovat morfologický obraz lymfocytární infiltrace v ektocervixu netransplantovaných děloh premenopauzálních žen ve fyziologickém terénu;

- charakterizovat imunohistochemický profil lymfocytární populace v ektocervixu netransplantovaných děloh premenopauzálních žen ve fyziologickém terénu;
- korelovat fyziologické nálezy s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn po transplantaci dělohy, zejména ve vztahu k tzv. borderline změnám;
- zhodnotit možnost využití imunohistochemie při histopatologické diagnostice rejekce transplantovaných děloh a sestavit panel vhodných protilátek;
- korelovat vliv menstruačního cyklu na lymfocytární infiltraci v ektocervixu netransplantovaných děloh premenopauzálních žen ve fyziologickém terénu.

2.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci

V případě transplantace plic jsme se zaměřili na bioptické hodnocení plicních explantátů příjemců. Mapovali jsme plicní megakaryocyty v základních skupinách postižení plic, které vedly k nutnosti LTx. Jako kontrolní tkáně jsme využívali části plicního parenchymu dárců, který nebyl využit k samotné transplantaci.

2.2.1 Hypotéza

Plicní megakaryocyty jsou opomíjeným typem buněk, a to i přesto, že bylo už před poměrně dlouhou dobou dokázáno, že trombocyty vznikají rozpadem megakaryocytů v plicích spíše než odštěpováním jejich cytoplazmy v kostní dřeni. Role plic pro biogenezi destiček je zcela zásadní – na celkovém počtu vytvořených trombocytů se podílí až z 50 % (Lefrançais et al., 2017; Levine et al., 2009; Martin et al., 1983; Pedersen, 2009; Trowbridge et al., 1982). Kromě jiného byla produkce destiček v plicích potvrzena porovnáním rozdílu intaktních megakaryocytů mezi plicní arteriální a aortální krví (Levine et al., 2009) a plicní arteriální a venózní krví (Scheinin and Koivuniemi, 1963). Funkce plicních megakaryocytů byla popsána i na myších modelech (Lefrançais et al., 2017; Yeung et al., 2020). Studie charakterizující tyto buňky alespoň částečně přímo v plicním parenchymu jsou však pouze ojedinělé a stanovují průměrný počet plicních megakaryocytů na hodnotu 14,65 buněk/cm^2 (Sharma and Talbot, 1986), respektive 16,8 buněk/cm^2 (Soares, 1992). Tyto práce byly ale prováděny na kadaverózních plicích v rámci nekroptických vyšetření (Sharma and Talbot, 1986; Soares, 1992). Nekroptické vzorky sdílí riziko autolýzy, která může skutečné počty buněk zkreslit, zvlášť pokud jde o populaci velkých a křehkých buněk, jakými jsou právě

megakaryocyty. Na druhou stranu je obtížné získat dostatečně velké a reprezentativní vzorky zdravého plicního parenchymu (alespoň 1 cm^2) z živých pacientů bioptickou cestou, ať už transbronchiální biopsií či kryobiopsií.

Hypotézou této studie bylo využití explantátů plic po transplantaci coby unikátního bioptického materiálu k charakterizaci těchto buněk. Cílili jsme zejména na mapování plicních megakaryocytů mezi různými příjemci, jejichž plíce byly terminálně poškozeny variabilními plicními chorobami. Jako kontrolní skupina byly vyšetřeny i relativně zdravé plíce kadaverózních dárců, jejichž části nebyly využity z důvodů přílišné velikosti (většinou lingula levé plíce/střední lalok pravé plíce), případně celé plíce v rámci provedení SLTx. Předpokládali jsme, že počet, charakter či distribuce plicních megakaryocytů se může mezi jednotlivými skupinami plicích chorob lišit a že tyto znaky by mohly být dalším cenným střípkem při skládání mozaiky jejich etiopatogeneze, případně diagnostickým znakem při histopatologické evaluaci daných procesů. Stimulem pro naši hypotézu byl náznak spojitosti mezi abnormální funkcí plicních megakaryocytů a vaskulárními chorobami ve starších studiích (Brown and Martin, 1994; Mandal et al., 2007; Martin et al., 1983).

2.2.2 Cíle práce

Cílem Experimentu 2 bylo:

- zmapovat celkový počet, charakteristiku a distribuci plicních megakaryocytů v explantátech plic příjemců na základě jejich původní klinicko-patologické diagnózy;
- obdobně popsat plicní megakaryocyty na nevyužitých plicích kadaverózních dárců, které představují relativně zdravý plicní parenchym, vybraný k provedení LTx. Na rozdíl od nekroptického materiálu je ošetřený aplikací prezervačního roztoku s krátkou dobou studené ischemie, což zabraňuje vzniku autolýzy;
- korelovat a statisticky vyhodnotit rozdíly v populacích plicních megakaryocytů mezi jednotlivými typy plicních chorob i relativně zdravým plicním parenchymem dárců;
- identifikovat plicní choroby, u kterých by kvantitativní/kvalitativní aberace plicních megakaryocytů mohly hrát roli v etiopatogenezi či případně sloužit jako diagnostický znak daného onemocnění.

3 METODIKA

3.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh

3.1.1 Kohorta pacientek

Do naší prospektivní non-randomizované studie bylo celkem zařazeno 54 premenopauzálních žen indikovaných k abdominální/laparoskopicky asistované vaginální hysterektomii z důvodů nesouvisejících s děložním hrdlem (ve všech případech šlo o benigní léze postihující děložní tělo). Konkrétně se jednalo o leiomyomy děložního těla (n = 25) a abnormální uterinní krvácení (n = 29), které byly potvrzeny hysteroskopicky. Před samotnou operací byla v celkové anestezii provedena ektocervikální biopsie bez kolposkopické kontroly. Tento postup jsme zvolili jako minimální zátěž participantek v souvislosti s jinak bolestivým bioptickým odběrem z ektocervixu. Biopsie byla odebírána z přední části ektocervixu v oblasti poblíž transformační zóny a endocervikálního kanálu děložního hrdla.

Mezi indikační kritéria k zařazení do studie jsme zahrnuli věk pacientek, benigní extracervikální léze vedoucí k hysterektomii a fyziologický preoperační nález na cervikálním stěru (Papanicolaouově testu). Mezi kontraindikace patřila vaginální či cervikální infekce v době biopsie, přítomnost perioperačního děložního krvácení, anamnéza imunitního či autoimunitního onemocnění a užívání imunosupresiv, včetně kortikosteroidů i jakýchkoli jiných léků ovlivňujících imunitní stav jejich uživatele. Po vysvětlení principu i záměrů studie a rizik souvisejících s odběrem ektocervikální biopsie jsme od všech účastnic získali informovaný souhlas. Dále jsme zaznamenali základní demografické údaje daných pacientek, včetně datace menstruačního cyklu gynekologem, a popisy histopatologických nálezů ze získaných bioptických odběrů.

Průměrný věk pacientek zahrnutých do studie představoval 45,1 let (rozmezí 36–54 let) a u všech se jednalo o premenopauzální období. Průměrný body mass index byl 26,6 ± 6.1 (rozmezí 17,1–40,8) a průměrná parita 1,9 ± 0,89 (rozmezí 0–4).

3.1.2 Histopatologické vyšetření

Bioptické vzorky o velikosti cca 3–4 × 6–8 mm byly ihned po odběru fixovány v neutrálním pufrovaném 4% formaldehydu a transportovány do histopatologické laboratoře, kde byla provedena jejich post-fixace a zalití do parafínových bločků. Parafínové bločky byly následně krájeny mikrotomem na tkáňové řezy tloušťky 4 μm a nabarveny přehledovým barvením hematoxylinem-eozinem (H&E) a speciálním barvením Massonovým trichromem použitým k odlišení kolagenních vláken v oblastech případné fibrotizace a intimální sklerózy arterií. Nabarvené řezy byly zamontovány krycími sklíčky.

Během histopatologického vyšetření jsme směřovali pozornost zejména na epitelo-stromální junkci a na přítomnost zánětlivé infiltrace v cervikálním stromatu. Cíleně jsme pátrali po známkách zánětlivých změn, včetně tzv. interface celulizace, přítomnosti mikrovaskulárních zánětlivých infiltrátů a perivaskulární stromální zánětlivé celulizace. Hodnotili jsme i stav cév stran případného průkazu arteriopatie (např. endotelitidy či intimální sklerózy) a epitelu stran případných regresivních změn, včetně dysplázie. Všechny vzorky byly vyšetřeny dvěma patology, kteří měli oba zkušenosti s hodnocením rejekčních změn v uterinních graftech.

3.1.3 Imunohistochemie (IHC)

Bioptické vzorky jsme vyšetřili také imunohistochemicky s průkazem exprese molekul CD45RO, CD8, CD4, CD20 a C4d, pro základní charakterizaci celulárních zánětlivých infiltrátů. Použili jsme tenké histologické řezy (tloušťky 3 μm) s následujícími protilátkami a laboratorními protokoly: anti-CD45RO protilátka (myší monoklonální protilátka, klon UCHL1 [Agilent-Dako, Santa Clara, CA, USA], ředění 1:300, demaskování antigenních epitopů varem v pufrovaném roztoku pH 6 ve vodní lázni); anti-CD8 protilátka (myší monoklonální protilátka, klon C8/144B-[Agilent-Dako, Santa Clara, CA, USA], ředění 1:200, demaskování antigenních epitopů varem v pufrovaném roztoku pH 9 ve vodní lázni); anti-CD4 protilátka (myší monoklonální protilátka, klon 4B12 [BioGenex Laboratories, Fremont, CA, USA], ředění 1:250, demaskování antigenních epitopů varem v pufrovaném roztoku pH 9 ve vodní lázni); anti-CD20 protilátka (myší monoklonální protilátka, klon L26 [Agilent-Dako, Santa Clara, CA, USA], ředění 1:300, demaskování antigenních epitopů varem v pufrovaném roztoku pH 6 ve vodní lázni); anti-C4d protilátka (myší monoklonální protilátka, klon A24-T [Zytomed Systems GmbH, Berlín, Německo], ředění 1:150, demaskování antigenních epitopů varem v pufrovaném roztoku pH 6 ve vodní lázni).

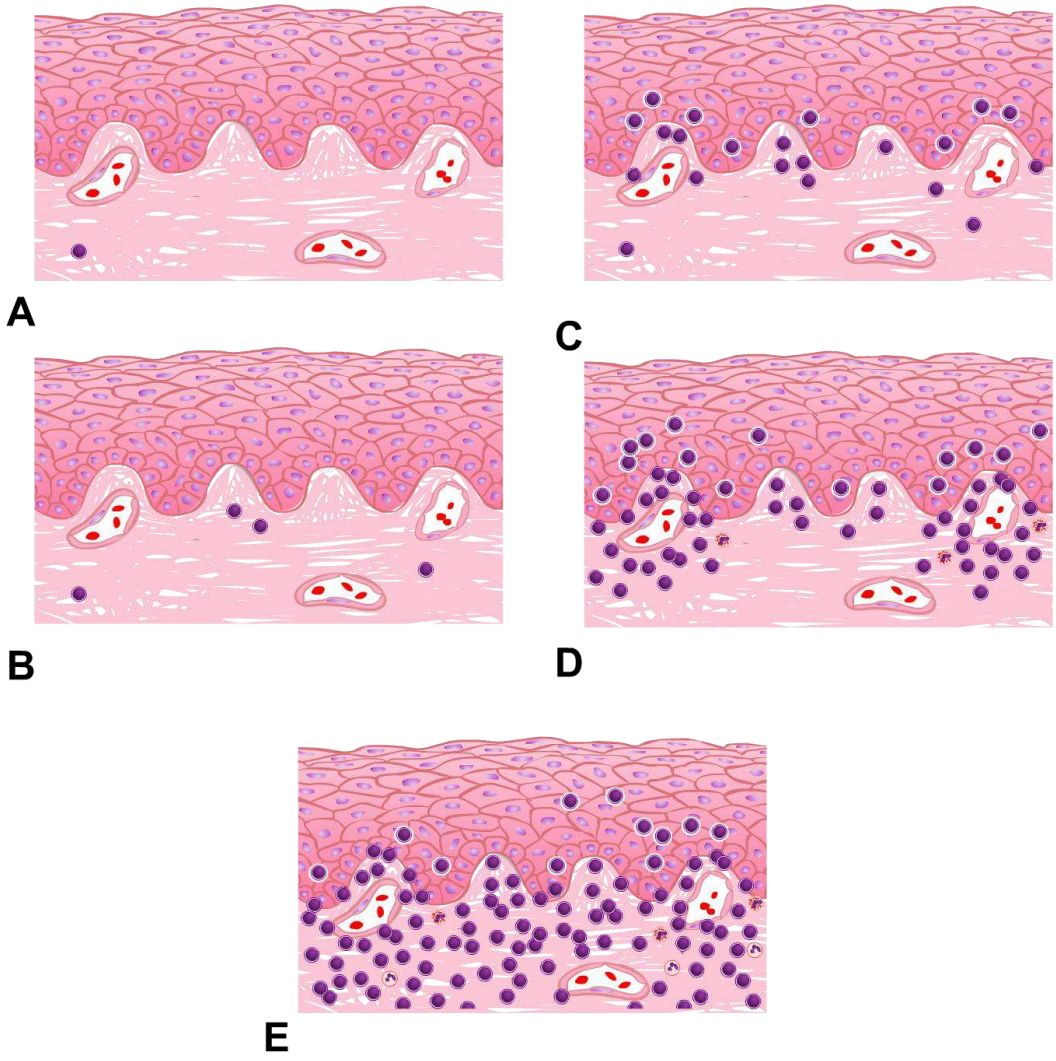
Detekce byla provedena prostřednictvím jednokrokového mikropolymerního non-biotinového systému (Bio-SB) s peroxidázovým komplexem a 3,3′-diaminobenzidin tetrahydrochloridem. Jádra byla dobarvena hematoxylinem.

3.1.4 Semikvantitativní skórovací systém

Pro charakterizaci lymfocytární populace v barvení H&E i v IHC jsme stanovili semikvantitativní skórovací systém, který oproti absolutním počtům buněk usnadňuje reprodukovatelnost a lépe odráží situaci při hodnocení rejekčních infiltrátů v praxi při rutinním odečítání biopsií graftu. Systém se zakládá na pětistupňovém skóre, které je definováno následujícími rysy a graficky znázorněno na schématu (obr. 4): *Kategorii 1* zahrnují případy, které obsahují maximálně 20 izolovaných lymfocytů v celém bioptickém materiálu (v provizorním skórovacím systému rejekčních změn po UTx by odpovídala normálnímu nálezu v ektocervikální biopsii – grade 0). *Kategorie 2* představuje nález nad 20 lymfocytů v odběru, které se však stále nacházejí pouze disperzně bez tendence k tvorbě shluků (také odpovídá normálnímu nálezu v provizorním skórovacím systému rejekčních změn po UTx; tyto první dvě kategorie byly odlišeny z klasifikačních důvodů s předpokládanou minimální účastí lymfocytů ve vzorcích netransplantovaných „zdravých" děloh premenopauzálních žen). *Kategorie 3* je definována přítomností shlukujících se lymfocytů v drobné klastry, nacházející se především v oblasti epitelo-stromální junkce (tato kategorie množstvím a charakterem lymfocytárních infiltrátů koresponduje s tzv. borderline změnami transplantovaných děloh). *Kategorii 4* charakterizuje nález ložiskových lymfocytárních infiltrátů, tj. různě velkých skupin lymfocytů až s obrazem primárních, případně sekundárních, lymfatických folikulů s/bez germinálních center a možnou účastí leukocytů jiných typů (daná množství lymfocytů se dle provizorního skórovacího systému rejekčních změn po UTx vyskytují u rejekce grade 1 až 2 – oba stupně obsahují nepřesně rozlišené ložiskové zánětlivé změny a spolehlivěji se odlišují přítomností stromálního edému/redukce povrchového epitelu s četnými apoptotickými tělísky u grade 2 rejekce). *Kategorii 5* určuje přítomnost difuzních splývajících infiltrátů lymfocytů s možnou účastí zánětlivých buněk dalších typů (odpovídá grade 3 rejekci v transplantovaných dělohách, kde mohou být zánětlivé elementy doprovázeny regresivními změnami až erozemi a ulceracemi výstelky či jinak vyjádřenou nekrózou ektocervikálních tkání).

Základní lymfocytární populace jsme zmapovali také imunohistochemicky s využitím markerů CD45RO (značí aktivované T-lymfocyty) a CD20 (B-lymfocyty). Tyto dva

základní typy lymfocytů jsme hodnotili pomocí výše uvedeného semikvantitativního skórovacího systému. Subpopulace T-lymfocytů byly dále charakterizovány pomocí markerů CD4 (pomocné/helper T-lymfocyty) a CD8 (cytotoxické T-lymfocyty). Subpopulace, jejíž počet přesahoval 80 % T-lymfocytární populace, byla označena za dominantní. V případech, kdy žádná subpopulace jednoznačně nepřevažovala, např. v případech výskytů pouze disperzních T-lymfocytů, byly subpopulace označeny za příměs. Pokud lymfocyty některého typu ve vzorku zcela chyběly, zaznamenali jsme jejich absenci.



Obr. 4. Schéma semikvantitativního skórovacího systému navrženého k charakterizaci lymfocytárních populací v ektocervixu netransplantovaných děloh premenopauzálních žen. **A:** *Kategorie 1*, tj. nález maximálně 20 izolovaných lymfocytů v celém bioptickém vzorku. **B:** *Kategorii 2* charakterizuje výskyt více než 20 lymfocytů v odběru, avšak stále se vyskytujících pouze izolovaně či disperzně (bez tendence k tvorbě shluků). **C:** *Kategorie 3*, definovaná přítomností drobných lymfocytárních shluků zejména v oblasti epitelo-stromální junkce. **D:** *Kategorie 4* s nálezem ložiskových lymfocytárních infiltrátů až s obrazem

primárních/sekundárních lymfatických folikulů. **E:** *Kategorie 5* určená difuzními splývajícími lymfocytárními infiltráty.

3.1.5 Etické aspekty

Protokol studie byl schválen na institucionálním zasedání Etické komise Fakultní nemocnice Motol (EK-34/20) 29. ledna 2020.

3.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci

3.2.1 Kohorta pacientů

Do naší studie jsme vybrali 50 pacientů zařazených do plicního transplantačního programu Fakultní nemocnice Motol mezi lety 2015 až 2021. Výběr se v případě příjemců (n = 30) odvíjel od jejich základní indikační klinicko-patologické diagnózy. Plíce kadaverózních dárců (n = 20) jsme zvolili na základě dostupnosti částí jejich nevyužitého parenchymu. Od každého účastníka studie byl získán informovaný souhlas ohledně výzkumného vyšetřování resekovaných orgánů a tkání; v případě kadaverózních dárců šlo o předpokládaný souhlas s odběrem orgánů, který je obecně platný v ČR. Zahrnutí pacienti byli následně rozděleni do čtyř skupin:

a) *Kadaverózní dárci* (n = 20), ze kterých byl pro studii použit plicní parenchym pro LTx nevyužitých částí plic. Jednalo se o nadměrně velké („oversized“) plíce, jejichž velikost musela být redukována, aby se vešly do dárcovy hrudní dutiny (v těchto případech byla zpravidla chirurgicky resekována lingula levé plíce a střední lalok pravé plíce). Eventuálně byla zahrnuta celá plicní křídla v případech, kdy byla provedena SLTx. Získaný plicní parenchym byl v každém případě před samotným odběrem makroskopicky vyšetřen a uznán vhodným pro transplantační účely. Absenci plicního postižení jsme následně potvrdili i mikroskopicky prostřednictvím histopatologického vyšetření. I přes kadaverózní původ dárcovských plic bylo zabráněno jejich autolýze okamžitou aplikací prezervačního roztoku (Perfadex) po odběru s krátkou dobou studené ischemie (pod osm hodin) a okamžitou formolovou fixací po transplantaci. Tato skupina tak sloužila jako kontrolní relativně zdravá kohorta. Průměrný věk kadaverózních dárců zahrnutých do studie představoval 55 let (rozmezí 30–76 let). Poměr pohlaví muži/ženy byl 6/14. U každého dárce jsme zaznamenali příčinu úmrtí, kterou ve všech případě představovala centrální (mozková) smrt.

b) *Příjemci s vaskulárními plicními chorobami* (n = 10). Tato skupina zahrnovala plicní explantáty osmi pacientů s IPAH, jednoho pacienta s plicní veno-okluzivní nemocí a jednoho pacienta s plicní kapilární hemangiomatózou. Průměrný věk příjemců s vaskulárními plicními chorobami zahrnutých do studie představoval 26,7 let (rozmezí 18–36 let). Poměr pohlaví muži/ženy byl 1/9. K objektivnímu vyjádření tíže postižení byla u všech pacientů zaznamenána předoperačně naměřená hodnota plicní hypertenze.

c) *Příjemci s restrikčními plicními chorobami* (n = 10). V této skupině bylo šest pacientů s diagnózou EAA, dva případy PPFE, jeden případ IPF a pacient trpící revmatoidním postižením plic (RPP) při revmatoidní artritidě. Průměrný věk příjemců s restrikčními plicními chorobami zahrnutých do studie byl 50,9 let (rozmezí 45–61 let). Poměr pohlaví muži/ženy byl 6/4. K objektivnímu vyjádření tíže postižení byla pacientům naměřena FVC, jejíž předoperačně naměřená hodnota byla zaznamenána spolu s hodnotou plicní hypertenze.

d) *Příjemci s obstrukčními plicními chorobami* (n = 10). Do této skupiny bylo zařazeno devět pacientů s CHOPN a jeden s panacinárním plicním emfyzémem v rámci deficitu α-1-antitrypsinu. Průměrný věk příjemců s restrikčními plicními chorobami zahrnutých do studie představoval 60,4 let (rozmezí 56–66 let). Poměr pohlaví muži/ženy byl 6/4. K objektivnímu vyjádření tíže postižení bylo pacientům naměřeno FEV_1, jehož předoperační naměřená hodnota byla zaznamenána spolu s hodnotou plicní hypertenze.

Ke stanovení uvedených diagnóz ve všech případech vedl klinický follow-up, CT vyšetření plic a histopatologická analýza bioptických vzorků plicního parenchymu. Zároveň jsme při sestavení kohorty zajistili rovnoměrnou distribuci laterality (obdobný počet levých a pravých plicních křídel) k zabránění zkreslení počtu plicních megakaryocytů v závislosti na lokalitě v plicním parenchymu. Obdobně jsme ověřili, že žádný pacient neměl v době odběru ani anamnesticky diagnostikovanou žádnou myeloproliferativní nemoc, myelodysplázií či jinou malignitu kostní dřeně, která by mohla zasáhnout do vyzrávání megakaryocytární řady a která by zároveň představovala kontraindikaci k LTx. V souvislosti s diferenciací destiček byla k uvedeným údajům zaznamenána i hladina trombocytů v krvi, vyšetřená u každého příjemce jeden den před transplantací v rámci předoperačního vyšetření.

3.2.2 Histopatologické vyšetření

Všechny plicní explantáty byly ihned po odběru fixovány v neutrálním pufrovaném 4% formaldehydu a transportovány do histopatologické laboratoře, kde byla provedena jejich post-fixace. Během makroskopického vyšetření jsme náhodným způsobem vybrali vzorky plicního parenchymu, aby se zabránilo zkreslení cíleným náběrem patologicky změněných/nezměněných oblastí. Dbalo se pouze na výše zmíněné rovnoměrné zastoupení levé a pravé plíce. Všechny vzorky měly plochu řezu min. velikosti 1 cm^2 a byly zality do

parafínových bločků. Parafínové bločky byly následně krájeny mikrotomem na tkáňové řezy tloušťky 4 μm a nabarveny přehledovým barvením H&E. Nabarvené řezy byly zamontovány krycími sklíčky.

3.2.3 Imunohistochemie

Bioptické vzorky jsme ke spolehlivé detekci plicních megakaryocytů vyšetřili také imunohistochemicky s průkazem exprese megakaryocytárního markeru CD61. Použili jsme tenké histologické řezy (tloušťky 3 μm) s protilátkou anti-CD61 (myší monoklonální protilátka, klon 2f2, Bio-SB, ředění 1:100; demaskování antigenních epitopů varem v pufrovaném roztoku pH 9 ve vodní lázni). Detekce byla provedena prostřednictvím jednokrokového mikropolymerního non-biotinového systému (Bio-SB) s peroxidázovým komplexem a 3,3′-diaminobenzidin tetrahydrochloridem. Jádra byla dobarvena hematoxylinem.

Hodnocení a kvantifikace plicních megakaryocytů se opíralo o nález imunohistochemicky znázorněných jaderných buněk, pozitivních v imunohistochemickém markeru CD61. Přítomnost jádra pomohla odlišit plicní megakaryocyty od CD61 pozitivních akumulovaných destiček a destičkových trombů. Při charakterizaci a mapování plicních megakaryocytů jsme zaznamenávali lokalizaci jejich výskytu a největší zastiženou velikost těchto buněk v každém vzorku. K určení velikosti se využívalo poměřování vůči erytrocytům, coby univerzálnímu histologickému měřidlu s konstantním průměrem erytrocytárních elementů 7,5 μm a hojným výskytem v prakticky všudypřítomných krevních cévách. Dle určeného poměru velikosti k erytrocytům jsme stanovili tři základní velikostní kategorie plicních megakaryocytů: velké (definované průměrem 50–100 μm a typickým obrazem megakaryocytů kostní dřeně s objemnou cytoplazmou), střední (definované velikostí 20–49 μm a obsaženým středním množstvím cytoplazmy) a malé (s velikostí pod 19 μm a patrným pouze úzkým lemem cytoplazmy). Dále jsme kvantifikovali absolutní počet přítomných megakaryocytů/1 cm^2 plicního parenchymu, vyznačený na histologickém sklíčku pomocí mřížky. Výsledky každé skupiny příjemců jsme porovnali se skupinou kadaverózních dárců a statisticky vyhodnotili.

3.2.4 Statistické vyhodnocení

Ke statistické analýze jsme použili t-test s výpočtem hodnoty p. Rozdíly byly považovány za významné při $p < 0,05$. Naměřené hodnoty byly vyobrazeny v boxplotech, které ukazují

skupinový průměr + střední chybu průměru a ve kterých symbol * označuje statistickou signifikanci, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4 VÝSLEDKY

4.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh

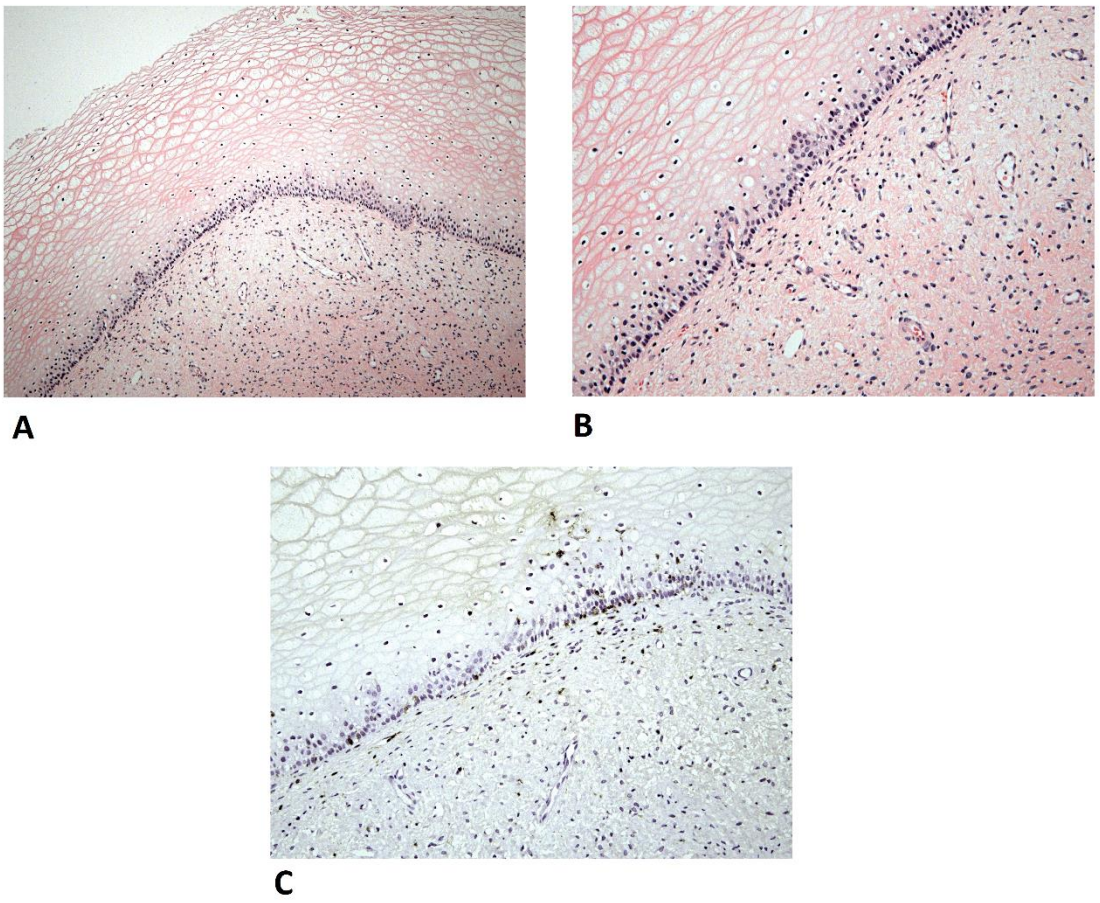
4.1.1 Ektocervikální nálezy

Z celkového počtu 54 bioptických odběrů jsme 52 vzorků vyhodnotili jako adekvátní se zastiženou oblastí ektocervixu. Všechny biopsie obsahovaly v alespoň malé míře vyjádřenou lymfocytární celulizaci stromatu, která v každém případě přesahovala 20 buněk. Žádný případ tudíž nespadal do Kategorie 1 navrženého semikvantitativního skórovacího systému k charakterizaci lymfocytárních populací (tab. 1).

Tab. 1. Lymfocytární populace v ektocervixu netransplantovaných žen v premenopauzálním věku.

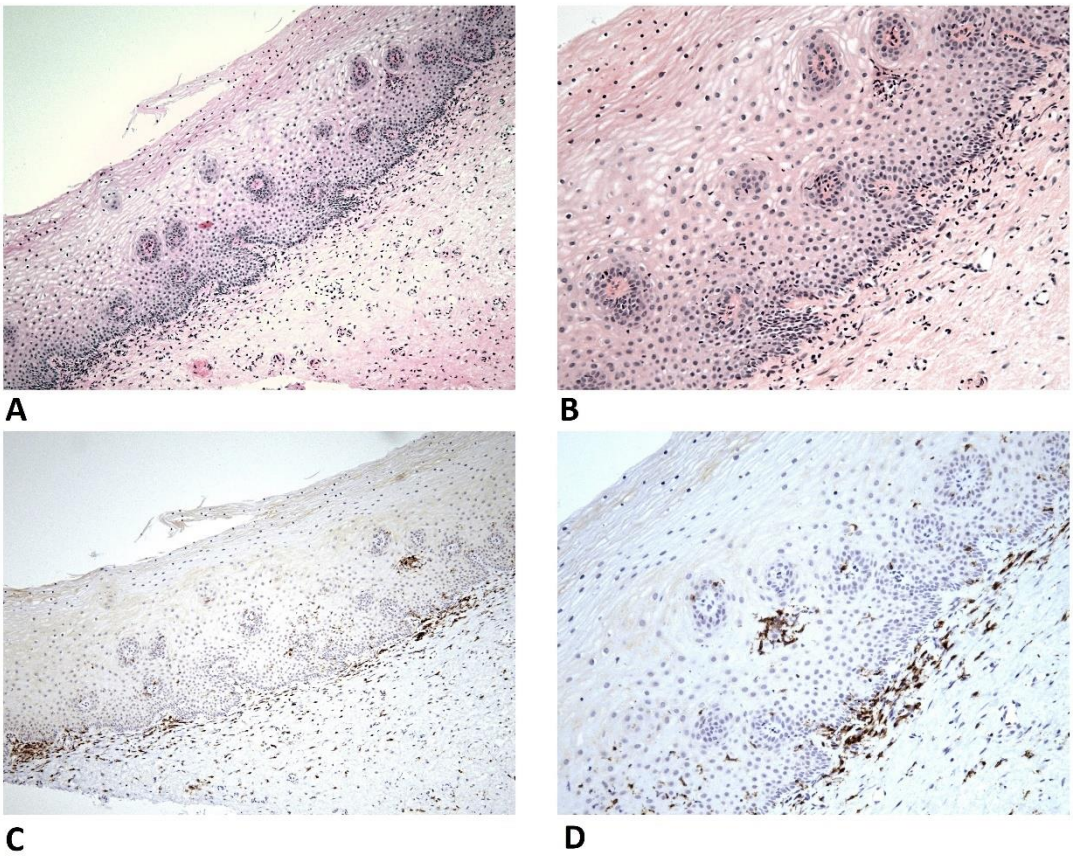
	n	**%**
Bioptické vzorky	52	100
Semikvantitativní skórovací systém CD45RO pozitivních T-lymfocytů		
Kategorie 1	0	0
Kategorie 2	5	9,6
Kategorie 3	43	82,7
Kategorie 4	4	7,7
Kategorie 5	0	0
Semikvantitativní skórovací systém CD20 pozitivních B-lymfocytů		
Kategorie 1	50	96,2
Kategorie 2	1	1,9
Kategorie 3	0	0
Kategorie 4	1	1,9
Kategorie 5	0	0

V pěti případech (9,6 %) se T-lymfocyty vyskytovaly izolovaně bez tvorby shluků v počtu nad 20 buněk ve vzorku a odpovídaly tedy Kategorii 2 (obr. 5).



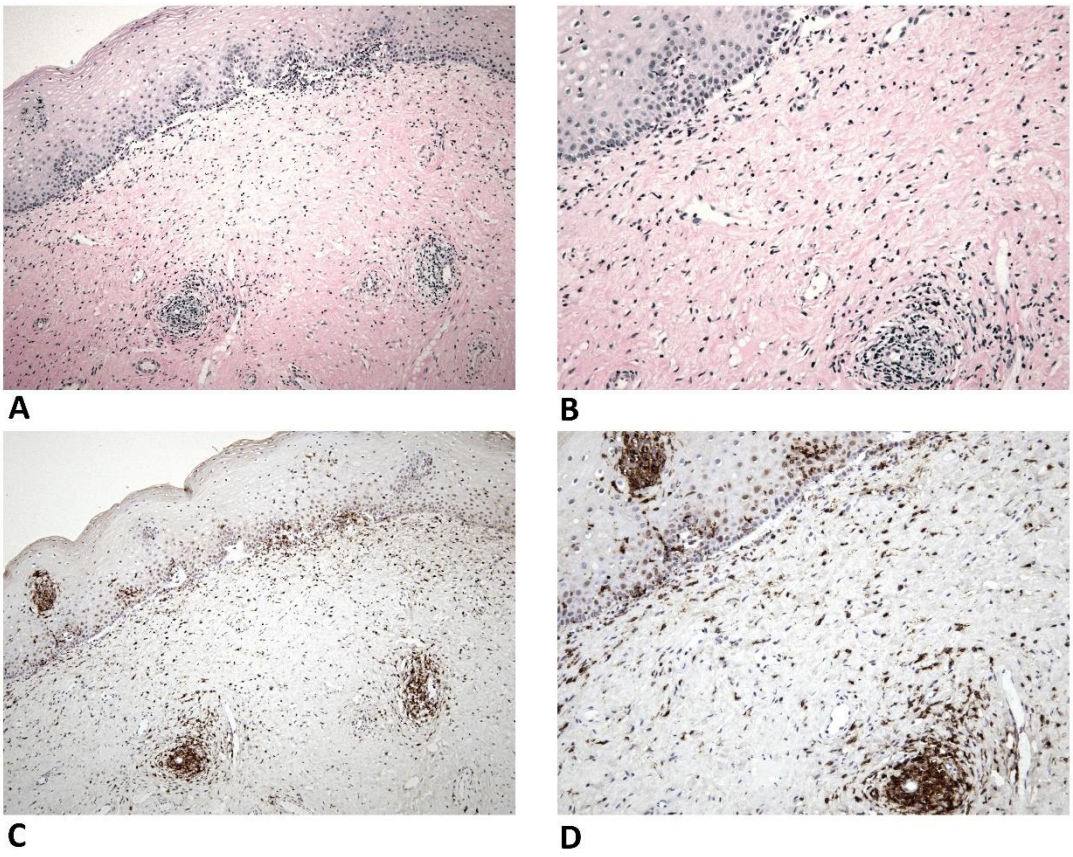
Obr. 5. Kategorie 2 semikvantitativního skórovacího systému lymfocytárních populací. **A:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (barvení H&E; zvětšení 100x) – subepiteliální stroma obsahuje disperzní izolované lymfocyty, které jsou nenápadné při zvětšení 100x. **B:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (barvení H&E; zvětšení 200x) – ve větším zvětšení objektivu jsou již izolované lymfocyty patrné. **C:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (IHC, barvení CD45RO; zvětšení 200x) – stejný případ se zvýrazněním T-lymfocytů pomocí imunohistochemického markeru CD45RO.

Většina vzorků nicméně vykazovala shlukující se T-lymfocyty zejména v oblasti epitelo-stromální junkce a ve 43 případech (82,7 %) tak korelovala s Kategorií 3 navrženého semikvantitativního skórovacího systému. Ve všech těchto biopsiích byl také identifikován intraepiteliální influx daných zánětlivých buněk, které izolovaně pronikaly mezi keratinocyty povrchového dlaždicového epitelu (obr. 6).



Obr. 6. Kategorie 3 semikvantitativního skórovacího systému lymfocytárních populací. **A:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (barvení H&E; zvětšení 100x) – shlukující se lymfocyty v oblasti epitelo-stromální junkce ektocervixu jsou patrné již na malé zvětšení objektivu. **B:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (barvení H&E; zvětšení 200x) – detail intraepiteliálního influxu izolovaných lymfocytů, který je patrný i v přehledovém barvení. **C:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (IHC, barvení CD45RO; zvětšení 100x) – imunohistochemické znázornění aktivovaných T-lymfocytů. **D:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (IHC, barvení CD45RO; zvětšení 200x) – detail intraepiteliálního influxu izolovaných lymfocytů.

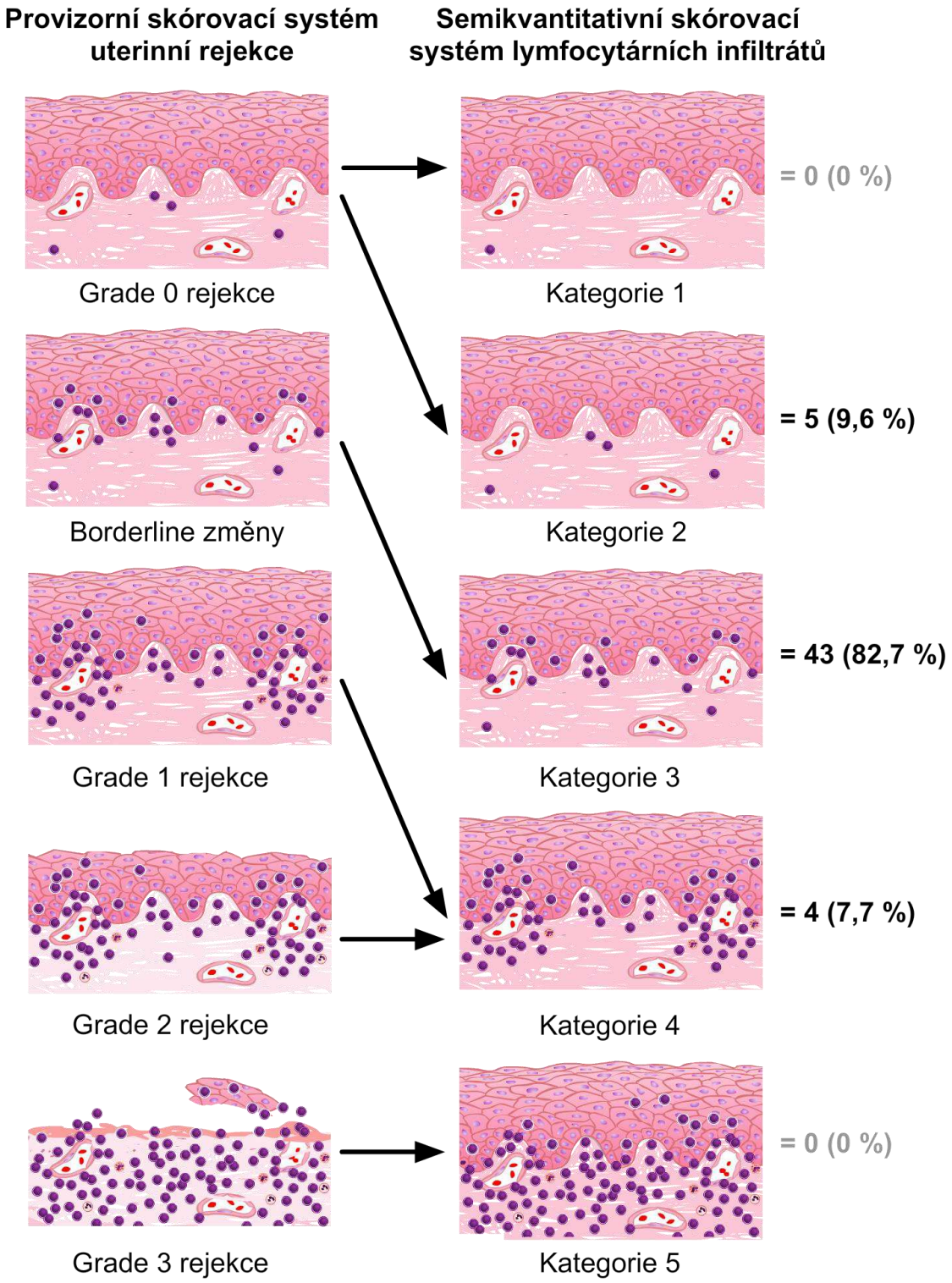
Další čtyři případy (7,7 %) obsahovaly fokální lymfocytární infiltráty odpovídající Kategorii 4 navrženého semikvantitativního skórovacího systému (obr. 7), ve kterých byla patrná velká ložiska lymfocytů nabývající až vzhledu primárních lymfatických folikulů. O pravé lymfatické folikuly však nešlo vzhledem k níže uvedené skladbě z převážně T-lymfocytů – tento obraz vznikl zejména perivaskulární distribucí těchto infiltrátů.



Obr. 7. Kategorie 4 semikvantitativního skórovacího systému lymfocytárních populací. **A:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (barvení H&E; zvětšení 100x) – velká ložiska lymfocytárních infiltrátů patrná i na malé zvětšení objektivu. **B:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (barvení H&E; zvětšení 200x) – morfologický dojem lymfatických folikulů je vyvolán akumulací četných lymfocytů perivaskulárně (v centru ložiska je zastiženo lumen cévy). Patrný je opět i intraepiteliální influx lymfocytů. **C:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (IHC, barvení CD45RO; zvětšení 100x) – stejný případ se zvýrazněním T-lymfocytů pomocí imunohistochemického markeru CD45RO. Ložiska infiltrátu jsou formovaná aktivovanými T-lymfocyty a nejde tedy o pravé lymfatické folikuly. **D:** Světelná mikroskopie ektocervikální biopsie (IHC, barvení CD45RO; zvětšení 200x) – stejný případ se zvýrazněním T-lymfocytů pomocí imunohistochemického markeru CD45RO a nápadným intraepiteliálním influxem zánětlivých elementů.

Ve zbývajících dvou případech z celkového počtu 54 bioptických vzorků se jednalo o neadekvátní odběry se zastižením izolovaných struktur endocervixu. Žádný ektocervikální vzorek neobsahoval difuzní lymfocytární infiltrát, který by koreloval s Kategorii 5 daného systému. Ze všech ektocervikálních vzorků byl v 51 případech (98 %) detekován intraepiteliální influx lymfocytů. Z dalších sledovaných změn nebyly v žádném vzorku patrné známky infekce lidským papilomavirem (HPV; tj. intraepiteliální dysplázie či koilocytóza) ani endotelitidy či intimální sklerózy cév. Nálezy byly ve shodě s morfologickým obrazem v resekátech dělohy po vzájemné korelaci. Celkové srovnání

provizorního skórovacího systému uterinní rejekce a navrženého semikvantitativního systému hodnocení T-lymfocytárních infiltrátů je přiloženo na schématu (obr. 8).



Obr. 8. Schematické srovnání provizorního skórovacího systému uterinní rejekce s navrženým semikvantitativním skórovacím systémem hodnocení lymfocytárních infiltrátů v cervikální biopsii. Odpovídající množství lymfocytů mezi jednotlivými stupni gradingu a semikvantitativními kategoriemi jsou spojeny šipkami. Absolutní a procentuální zastoupení jednotlivých kategorií v dané kohortě pacientek je vyjádřeno číselně.

Pomocí imunohistochemické analýzy lymfocytárních populací ektocervixu jsme zjistili, že většinu zánětlivých elementů tvoří aktivované T-lymfocyty (ve všech případech pozitivní v imunohistochemickém markeru CD45RO). T-lymfocyty byly dále sub-kategorizovány na jednotlivé podtypy podle exprese znaků Th-/Tc-lymfocytů (tj. imunohistochemických markerů CD4 a CD8). Ve 24 případech (46,2 %) představovaly dominantní subpopulaci T-lymfocytů cytotoxické buňky (pozitivní v průkazu markeru CD8). V šesti případech (11,5 %) byly cytotoxické T-lymfocyty roztroušené a představovaly pouze příměs. V 17 vzorcích (32,7 %) se nacházely pouze izolovaně a v pěti případech (9,6 %) byl imunohistochemický marker CD8 zcela negativní. Zbylé dva případy byly k bližšímu mapování neadekvátní z důvodu odběru endocervikální partie děložního hrdla bez zastižených struktur ektocervixu. 49 vzorků (94,2 %) bylo negativní v imunohistochemickém průkazu markeru CD4 a ve 3 případech (5,8 %) byly detekovány izolované helpery coby příměs T-lymfocytární populace.

Ve srovnání s T-lymfocyty představovaly v ektocervixu B-lymfocyty minoritní část lymfocytárních infiltrátů. Zcela chyběly ve 41 vzorcích (78,8 %) a v devíti případech (17,3 %) jejich počet nepřesahoval 20 buněk, čímž dohromady v 96,2 % odpovídaly Kategorii 1 podle semikvantitativního skórovacího systému k charakterizaci lymfocytárních populací. S Kategorií 2 koreloval jediný vzorek (1,9 %), kde se nacházely roztroušené lymfocyty přesahující počet 20 buněk v materiálu. Ve zbývajícím ektocervikálním odběru (1,9 %) byl patrný ložiskový infiltrát B-lymfocytů spadající do Kategorie 4 navrženého systému. Přesvědčivé morfologické obrazy Kategorie 3 ani 5 nebyly v populaci B-lymfocytů ektocervixu zastiženy. Tento nález minoritní účasti B-lymfocytů v infiltrátech zrcadlí imunofenotyp lymfocytů z provizorního skórovacího systému rejekčních změn po UTx (Mölne et al., 2017).

Většina ektocervikálních biopsií tedy obsahovala shlukující se lymfocytární infiltráty zejména v oblasti epitelo-stromální junkce s vyjádřeným intraepiteliálním influxem. Dominantní populací byly aktivované T-lymfocyty (pozitivní v imunohistochemickém markeru CD45RO) s dominantní subpopulací CD8 pozitivních cytotoxických buněk; CD4 pozitivní pomocné T-lymfocyty a B-lymfocyty byly v ektocervixu zastiženy poměrně vzácně.

4.1.2 Endocervikální nálezy

Cílem bioptických odběrů byl zisk ektocervikálních tkání, avšak vzhledem k náběru poblíž transformační zóny až endocervikálního kanálu bez kolposkopické kontroly byly v 15 případech (27,8 %) ve vzorku zastiženy též struktury endocervixu. Ve všech případech se v endocervikální porci biopsie nacházely zánětlivé změny, které byly v porovnání s ektocervixem intenzivnější (tab. 2).

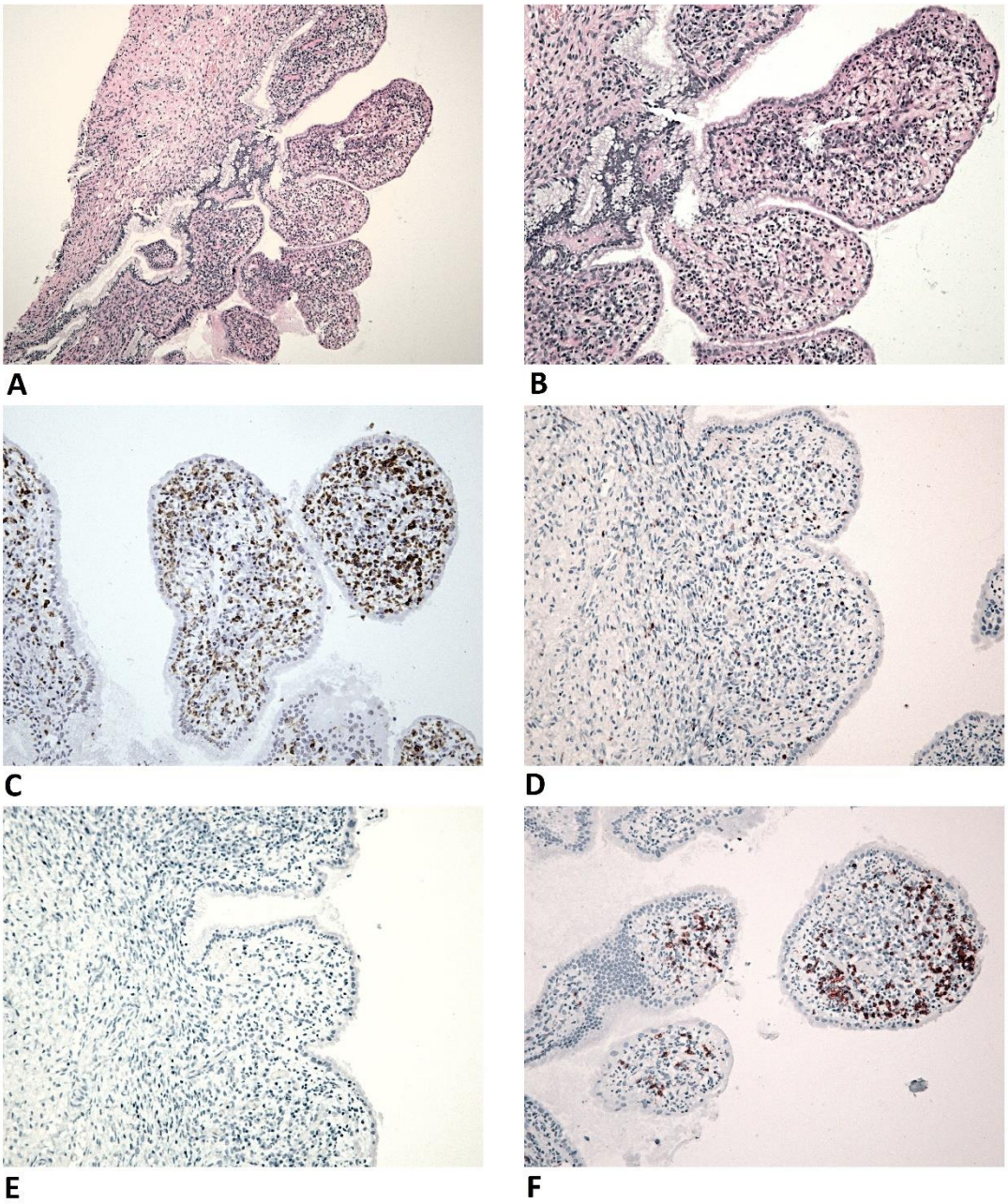
Tab. 2. Lymfocytární populace v endocervixu netransplantovaných žen v premenopauzálním věku.

	n	**%**
Bioptické vzorky	15	100
Semikvantitativní skórovací systém CD45RO pozitivních T-lymfocytů		
Kategorie 1	0	0
Kategorie 2	0	0
Kategorie 3	1	6,7
Kategorie 4	11	73,3
Kategorie 5	3	20,0
Semikvantitativní skórovací systém CD20 pozitivních B-lymfocytů		
Kategorie 1	1	6,7
Kategorie 2	0	0
Kategorie 3	4	26,6
Kategorie 4	10	66,7
Kategorie 5	0	0

Zánětlivé změny sestávaly z převážně lymfocytárních infiltrátů a často byly patrné již na malé zvětšení (obr. 9). V 11 případech (73,3 %) byly patrné fokální infiltráty odpovídající Kategorii 4 semikvantitativního skórovacího systému lymfocytárních populací. Další tři případy (20 %) vykazovaly difuzní lymfocytární infiltráty korelující s Kategorií 5 daného systému, která v ektocervixu nebyla přítomná. Zbývající případ (6,7 %) spadal do Kategorie 3, definované shlukujícími se lymfocyty. Imunoprofil lymfocytů odpovídal zejména aktivovaným T-buňkám s pozitivitou imunohistochemického markeru CD45RO. Většinu T-lymfocytů zastupovaly CD8 pozitivní cytotoxické T-buňky, které v 11 případech (73,3 %) představovaly dominantní subpopulaci obdobně jako v ektocervixu. Tři vzorky (20 %) však obsahovaly pouze izolované Tc-lymfocyty a jeden byl zcela negativní v průkazu markeru CD8. Žádné CD4 pozitivní helpery nebyly v endocervixu detekovány.

Mezi imunofenotypy lymfocytárních populací ektocervixu a endocervixu jsme identifikovali podstatný rozdíl v přítomnosti hojných CD20 pozitivních B-lymfocytů

v endocervixu, které byly jen vzácně zastižené v ektocervixu. Ve čtyřech případech (26,6 %) endocervikálních biopsiích byly patrné shlukující se B-lymfocyty s obrazem Kategorie 3 navrženého semikvantitativního systému, které v dalších deseti vzorcích (66,7 %) formovaly dokonce ložiskové infiltráty typické pro Kategorii 4. Zbývající případ (6, 7 %) obsahoval pouze izolované CD20 pozitivní lymfocyty pod hranicí 20 buněk a tudíž odpovídající Kategorii 1. Vyšetřovaný imunohistochemický marker C4d byl negativní ve všech případech ektocervikálních i endocervikálních odběrů.



Obr. 9. Endocervikální zánětlivé infiltráty. **A:** Světelná mikroskopie endocervikální biopsie (barvení H&E; zvětšení 100x) – neadekvátní odběr se zastižením pouze endocervikální tkáně bez vyžadovaných ektocervikálních struktur. Již na malé zvětšení jsou patrné difuzní splývající lymfocytární infiltráty

charakteristické pro Kategorii 5 navrženého semikvantitativního skórovacího systému. **B:** Světelná mikroskopie endocervikální biopsie (barvení H&E; zvětšení 200x) – detail difuzního infiltrátu lymfocytů v endocervikálním stromatu. **C:** Světelná mikroskopie endocervikální biopsie (IHC, barvení CD45RO; zvětšení 200x) – podobně jako v ektocervixu, i v endocervixu představují T-buňky dominantní lymfocytární populaci. **D:** Světelná mikroskopie endocervikální biopsie (IHC, barvení CD8; zvětšení 200x) – imunohistochemické znázornění CD8 pozitivní subpopulace cytotoxických T-lymfocytů. **E:** Světelná mikroskopie endocervikální biopsie (IHC, barvení CD4; zvětšení 200x) – negativita imunohistochemického markeru CD4. **F:** Světelná mikroskopie endocervikální biopsie (IHC, barvení CD20; zvětšení 200x) – oproti ektocervixu se v endocervixu nachází hojné CD20 pozitivní B-lymfocyty.

4.1.3 Vliv menstruačního cyklu na lymfocytární infiltráty v ektocervixu

Z celkového počtu 54 biopsií bylo 26 nabráno v proliferační a 28 v sekreční fázi menstruačního cyklu. Klinicky stanovená datace menstruačního cyklu byla u každého případu potvrzena histopatologickým vyšetřením endometria v odebrané děloze. Meziskupinové srovnání nepotvrdilo vliv fáze menstruačního cyklu na celulární zánětlivé infiltráty v ektocervixu. Více detailů ohledně lymfocytárních populací ektocervixu a endocervixu ve vztahu k menstruačnímu cyklu je uvedeno v tab. 3.

Tab. 3. Korelace nálezů populací lymfocytů ektocervixu a endocervixu ve vztahu k menstruačnímu cyklu.

Údaje pacientek stran menstruačního cyklu						**Kategorie 1–5 navrženého semikvantitativního skórovacího systému**			
Č.	**Věk (r.)**	**Délka cyklu**	**Délka krvácení**	**Menstruační fáze**	**Porody**	**Ektoc. T-buňky**	**Ektoc. B-buňky**	**Endoc. T-buňky**	**Endoc. B-buňky**
1	45	28	4	sekreční	0	2	1	N.	N.
2	45	28	7	sekreční	3	3	1	N.	N.
3	40	28	5	sekreční	4	3	1	N.	N.
4	40	28	7	proliferační	2	N.	N.	4	4
5	51	28	5	proliferační	2	2	1	N.	N.
6	38	28	5	proliferační	2	3	1	N.	N.
7	44	28	4	proliferační	2	4	1	N.	N.
8	45	22–28	12	proliferační	3	3	1	4	3
9	46	19–21	4	sekreční	3	3	1	5	4
10	39	28–29	5	sekreční	3	N.	N.	5	4
11	52	28	7	proliferační	2	2	1	N.	N.
12	37	26–32	10	sekreční	1	3	1	4	4
13	43	28	5	sekreční	2	3	1	3	3
14	43	28	5	proliferační	2	3	1	N.	N.
15	42	28	7	sekreční	4	3	1	N.	N.

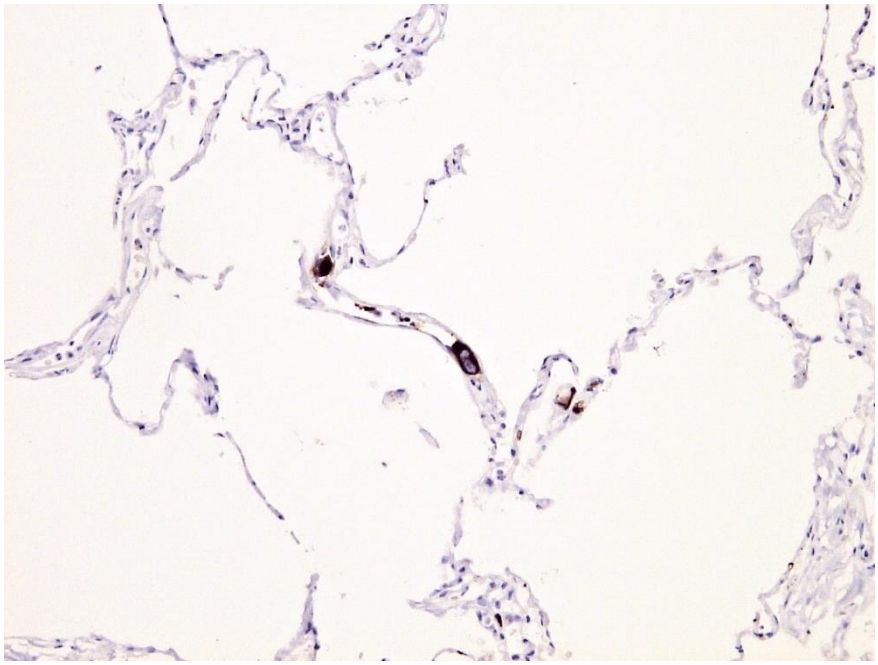
16	40	28	4	proliferační	2	3	1	4	4
17	54	26–28	5	proliferační	0	3	1	N.	N.
18	47	28	5	sekreční	2	3	1	N.	N.
19	47	28	5	proliferační	1	3	1	N.	N.
20	43	27	7	proliferační	2	3	1	N.	N.
21	50	28	5	sekreční	1	4	4	N.	N.
22	45	28	5	proliferační	3	3	1	N.	N.
23	49	21	3	sekreční	2	3	1	N.	N.
24	48	27	7	proliferační	2	3	1	N.	N.
25	48	28	4	proliferační	2	3	1	4	4
26	45	28–35	5	sekreční	0	3	1	N.	N.
27	45	24	7	sekreční	1	3	1	4	4
28	53	24	8	sekreční	3	3	1	N.	N.
29	47	25	4	proliferační	0	3	1	4	1
30	45	28	5	proliferační	1	3	1	N.	N.
31	44	28	5	proliferační	1	4	1	N.	N.
32	36	30–31	15	sekreční	2	3	1	4	3
33	40	28	5	sekreční	2	3	1	N.	N.
34	42	28	5	sekreční	2	3	1	N.	N.
35	44	28	6	proliferační	2	3	1	N.	N.
36	45	28	4	sekreční	1	3	1	N.	N.
37	42	29	5	sekreční	2	2	1	N.	N.
38	46	28	5	proliferační	1	3	1	N.	N.
39	50	28	7	proliferační	2	3	1	N.	N.
40	45	28	8	sekreční	2	3	1	N.	N.
41	46	30	5	sekreční	2	3	1	N.	N.
42	54	28	5	sekreční	3	2	1	N.	N.
43	42	26–28	4	sekreční	2	3	1	N.	N.
44	44	23–28	5	proliferační	2	3	1	4	3
45	43	28	8	sekreční	1	3	1	N.	N.
46	44	28	7	sekreční	2	3	2	N.	N.
47	47	28–30	9	proliferační	1	3	1	N.	N.
48	50	28	5	proliferační	2	3	1	N.	N.
49	42	ne	ne	sekreční	2	3	1	4	4
50	48	30	5	proliferační	2	4	1	N.	N.
51	50	28	5	proliferační	3	3	1	N.	N.
52	47	21	11	sekreční	3	3	1	5	4
53	47	26–28	5–7	proliferační	2	3	1	N.	N.
54	43	28	6	sekreční	2	3	1	4	4

Vysvětlivky: Ektoc., ektocervix; Endoc., endocervix; N, nezastižen.

4.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci

4.2.1 Výsledky kontrolní skupiny kadaverózních dárců

Ve skupině kadaverózních dárců (n = 20) jsme pozorovali interindividuální rozdíly v počtech plicních megakaryocytů. Průměrný počet megakaryocytů na 1 cm^2 ± SD odpovídal hodnotě 33,55 ± 22,56 buněk/cm^2 (rozmezí 6–83 megakaryocytů/cm^2). Ve všech případech se tyto buňky nacházely v lumen kapilár interalveolárních sept plicního parenchymu. Cytomorfologie megakaryocytů zahrnovala zejména střední velikost v 15 případech (75 %). Tři případy (15 %) obsahovaly maximálně malé formy plicních megakaryocytů s pouze tenkým lemem cytoplazmy, které nebyly patrné v barvení HE a připomínaly tzv. „nahá jádra“. Zbývající velké formy s bohatou cytoplazmou se nacházely ve dvou případech (10 %). Všechny vzorky obsahovaly pouze izolované plicní megakaryocyty bez tendence k tvorbě shluků (obr. 10).



Obr. 10. Světelná mikroskopie biopsie plicního parenchymu dárce (IHC, barvení CD61; zvětšení 200x) – imunohistochemicky jsou znázorněné plicní megakaryocyty nacházející se izolovaně v lumen kapilár interalveolárních sept. Maximální velikost daných buněk odpovídá stanovené střední formě.

Více detailů ohledně charakteristiky kontrolní skupiny kadaverózních dárců s relativně zdravým plicním parenchymem a jejich plicních megakaryocytů je uvedeno v tab. 4.

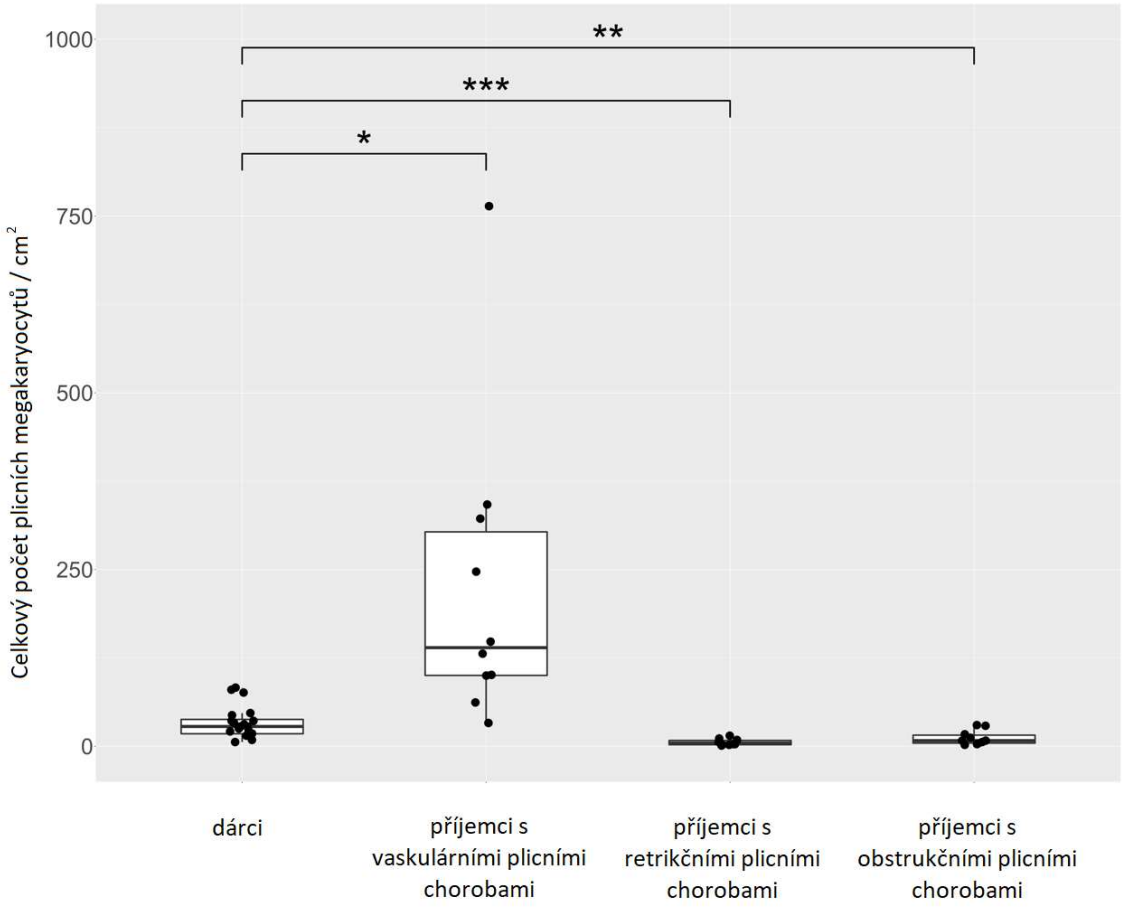
Tab. 4. Charakteristika kadaverózních dárců a jejich plicních megakaryocytů.

Kadaverózní dárci					**Plicní megakaryocyty**		
Č.	**Pohlaví**	**Věk (r.)**	**Příčina smrti**	**Explantát**	**n/cm^2**	**Lokalita**	**Největší velikost**
1	muž	46	SAH	levá plíce	6	IS	malé (izolované)
2	muž	56	CMP	pravý střední lalok	47	IS	střední (izolované)
3	muž	42	CE	pravý střední lalok	36	IS	střední (izolované)
4	žena	60	CMP	lingula	22	IS	střední (izolované)
5	žena	71	CE	pravý střední lalok	31	IS	střední (izolované)
6	muž	39	CE	pravý střední lalok	76	IS	velké (izolované)
7	žena	76	SAH	pravý střední lalok	33	IS	střední (izolované)
8	žena	67	SAH	pravá plíce	17	IS	střední (izolované)
9	žena	69	SAH	pravý střední lalok	28	IS	střední (izolované)
10	žena	54	RAC	pravý střední lalok	83	IS	velké (izolované)
11	žena	50	SAH	pravý střední lalok	28	IS	střední (izolované)
12	žena	71	CMP	pravý horní lalok	9	IS	střední (izolované)
13	žena	35	CE	lingula	44	IS	střední (izolované)
14	žena	60	SAH	pravý střední lalok	15	IS	malé (izolované)
15	muž	53	CMP	lingula	25	IS	střední (izolované)
16	žena	46	CMP	lingula	18	IS	střední (izolované)
17	žena	64	SAH	levá plíce	16	IS	střední (izolované)
18	žena	54	SAH	pravý střední lalok	36	IS	malé (izolované)
19	žena	62	CMP	lingula	21	IS	střední (izolované)
20	muž	30	MT	pravý střední lalok	80	IS	střední (izolované)

Vysvětlivky: SAH, subarachnoidální hemoragie; CMP, cévní mozková příhoda; CE, cerebrální edém; RAC, ruptura arteria carotis; MT, mozkové trauma; IS, interalveolární septa.

4.2.2 Výsledky jednotlivých skupin příjemců

Mezi příjemci (n = 30) se charakter plicních megakaryocytů velmi lišil v závislosti na konkrétní skupině, ve které se nacházeli. Statistické zhodnocení zastoupení plicních megakaryocytů všech skupin je znázorněno prostřednictvím boxplotů/krabicových grafů (obr. 11).



Obr. 11. Boxploty (krabicové grafy) s outliery (odlehlými hodnotami), zakreslenými prostřednictvím bodů znázorňující specifické počty plicních megakaryocytů na cm^2 a statistické rozdíly mezi jednotlivými skupinami příjemců a kontrolní skupinou kadaverózních dárců.

Více detailů ohledně charakteristiky jednotlivých skupin příjemců a jejich plicních megakaryocytů je uvedeno v tab. 5.

Tab. 5. Charakteristika jednotlivých skupin příjemců a jejich plicních megakaryocytů.

Příjemci s vaskulárními plicními chorobami									
Pacienti							**Plicní megakaryocyty**		
Č.	**Pohlaví**	**Věk (r.)**	**Dg.**	**PH (mm/Hg)**	**Explantát**	**PLTx 10^9/l**	**n/cm²**	**Lokal.**	**Největší velikost**
1	žena	28	IPAH	55	levá plíce	95	342	IS	velké (S)
2	žena	18	IPAH	74	pravá plíce	80	322	IS	velké (S)
3	žena	28	IPAH	55	pravá plíce	208	148	IS	střední (S)
4	žena	21	VON	42	pravá plíce	93	101	IS	střední (S)
5	žena	32	IPAH	67	levá plíce	159	764	IS	velké (S)
6	žena	36	PKH	78	levá plíce	160	33	IS	střední (S)
7	muž	32	IPAH	38	pravá plíce	265	62	IS	velké (S)
8	žena	19	IPAH	69	levá plíce	99	100	IS	velké (S)
9	žena	21	IPAH	76	levá plíce	179	247	IS	velké (S)
10	žena	32	IPAH	59	levá plíce	79	131	IS	velké (S)

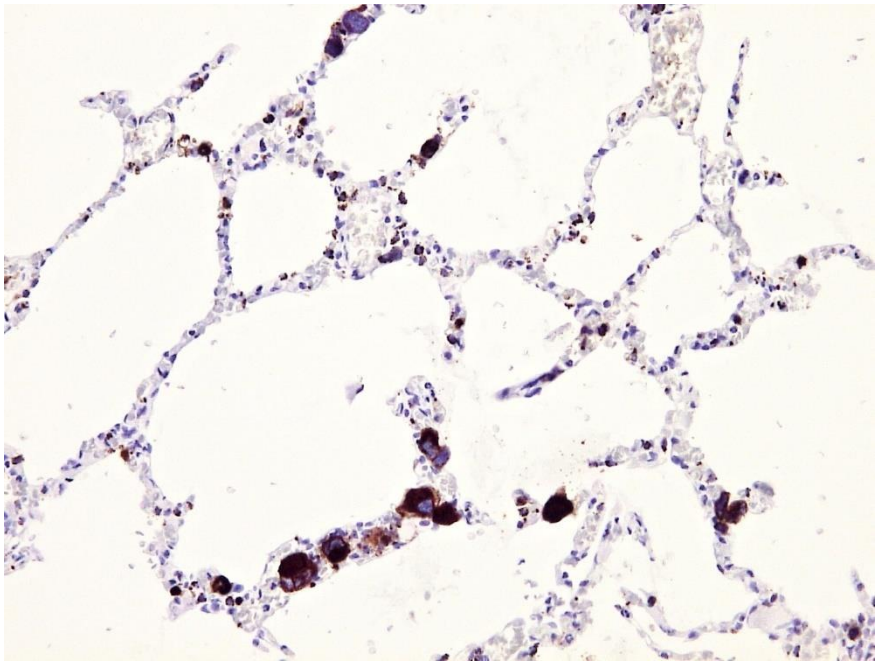
Příjemci s restrikčními plicními chorobami										
Pacienti								**Plicní megakaryocyty**		
Č.	**Pohlaví**	**Věk (r.)**	**Dg.**	**PH (mm/Hg)**	**FVC (%)**	**Explantát**	**PLTx 10^9/l**	**n/cm²**	**Lokal.**	**Největší velikost**
1	muž	50	EAA	11	55,1	p. plíce	183	6	IS	střední (I)
2	muž	51	EAA	44	47,3	l. plíce	82	9	IS	střední (I)
3	muž	53	RPP	20	28,9	p. plíce	230	3	IS	střední (I)
4	muž	46	EAA	19	32,7	l. plíce	136	15	IS	střední (I)
5	muž	49	EAA	16	48,4	p. plíce	282	11	IS	střední (I)
6	žena	61	EAA	26	31,1	l. plíce	229	2	IS	střední (I)
7	muž	55	IPF	17	55,7	p. plíce	249	2	IS	střední (I)
8	žena	49	EAA	37	26,6	p. plíce	320	6	IS	střední (I)
9	žena	50	PPFE	20	29,3	l. plíce	248	3	IS	střední (I)
10	žena	45	PPFE	23	17,5	l. plíce	135	1	IS	malé (I)

Příjemci s obstrukčními plicními chorobami										
Pacienti								**Plicní megakaryocyty**		
Č.	**Pohlaví**	**Věk (r.)**	**Dg.**	**PH (mm/Hg)**	**FEV_1 (%)**	**Explantát**	**PLTx 10^9/l**	**n/cm²**	**Lokal.**	**Největší velikost**
1	žena	57	CHOPN	21	17,1	p. plíce	114	17	IS	střední (I)
2	muž	65	CHOPN	27	18,9	l. plíce	240	30	IS	střední (I)
3	muž	59	CHOPN	24	30,5	l. plíce	154	2	IS	střední (I)
4	muž	56	CHOPN	35	19,0	p. plíce	354	29	IS	velké (I)

5	muž	66	CHOPN	27	23,2	l. plíce	267	8	IS	malé (I)
6	žena	57	CHOPN	31	21,4	p. plíce	158	4	IS	střední (I)
7	muž	63	CHOPN	38	34,1	l. plíce	424	12	IS	střední (I)
8	žena	59	deficit α-1-antitryp.	13	35,1	p. plíce	186	6	IS	střední (I)
9	žena	64	CHOPN	17	23,9	p. plíce	270	3	IS	střední (I)
10	muž	58	CHOPN	36	22,5	l. plíce	258	8	IS	malé (I)

Vysvětlivky: IS, interalveolární septa; I, izolované; S, shlukující; PH, plicní hypertenze.

Největší zastoupení plicních megakaryocytů jsme pozorovali ve skupině příjemců s vaskulárními plicními chorobami (n = 10). Průměrný počet megakaryocytů na 1 cm^2 ± SD odpovídal hodnotě 225 ± 216,87 buněk/cm^2 (rozmezí 33–764 megakaryocytů/cm^2). Tento nález představuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kadaverózními dárci (p = 0,021). Tato skupina příjemců zahrnovala pacienta s diagnózou PKH, jehož plicní parenchym v této kohortě vykazoval nejnižší hodnotu průměrného počtu megakaryocytů, konkrétně 33 buněk/cm^2. A dále pak pacienta s diagnózou plicní VON, v jehož plicích jsme také detekovali nižší průměrný počet megakaryocytů v porovnání s ostatními příjemci s vaskulární plicní poruchou, konkrétně 101 buněk/cm^2. Všichni zbývající pacienti měli diagnostikovanou IPAH. Pokud jsme zahrnuli pouze tyto jedince, zvýšil se průměrný počet plicních megakaryocytů na 264,5 ± 226,3 buněk/cm^2 (rozmezí 62–764 megakaryocytů/cm^2). Skupina příjemců s vaskulárními plicními chorobami také jako jediná vykazovala určité morfologické rysy, které jsme nezastihli v ostatních kohortách. Mezi tyto znaky patřilo shlukování megakaryocytů do aglomerátů několika buněk v kapilárním lumen interalveolárních sept, které byly patrné ve všech případech (obr. 12). Lišila se i cytomorfologie těchto buněk – v sedmi případech (70 %) šlo o velké formy, které byly v jiných kohortách zastiženy jen vzácně. Zbývající tři vzorky (30 %) obsahovaly maximálně střední formy plicních megakaryocytů.



Obr. 12. Světelná mikroskopie biopsie plicního parenchymu příjemce s diagnózou IPAH (IHC, barvení CD61; zvětšení 200x) – imunohistochemicky jsou znázorněny plicní megakaryocyty, které se v kapilárním lumen interalveolárních sept shlukují a dosahují v navrhovaném systému velké velikosti.

Nejnižší denzitu plicních megakaryocytů jsme detekovali ve skupině příjemců trpících restrikčními plicními chorobami (n = 10). Průměrný počet megakaryocytů na 1 cm^2 ± SD odpovídal hodnotě 5,8 ± 4,6 buněk/cm^2 (rozmezí 1–15 megakaryocytů/cm^2). Tento nález představuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kadaverózními dárci (p = 0,0001). Obdobně jako u kontrolní skupiny kadaverózních dárců se i zde ve všech případech nacházely plicní megakaryocyty pouze izolovaně v lumen kapilár interalveolárních sept a žádný vzorek nevykazoval jejich shlukování. U devíti pacientů (90 %) byly zastiženy maximálně středně velké plicní megakaryocyty. Výjimkou byl jeden případ (10 %) s obsaženými pouze jejich malými formami.

V porovnání s kontrolní skupinou kadaverózních dárců vykazoval plicní parenchym příjemců s obstrukčními plicními chorobami (n = 10) nižší počty plicních megakaryocytů, ale ne v takové míře jako u příjemců s restrikčními plicními chorobami. Průměrný počet megakaryocytů na 1 cm^2 ± SD odpovídal hodnotě 11,9 ± 10,3 buněk/cm^2 (rozmezí 2–30 megakaryocytů/cm^2). Tento nález představuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kadaverózními dárci (p = 0,001). Ve všech případech se plicní megakaryocyty opět nacházely pouze izolovaně v lumen kapilár interalveolárních sept. U sedmi pacientů (70 %)

byla největším cytomorfologickým obrazem střední forma, u dvou případů (20 %) malá forma plicních megakaryocytů a ve zbývajícím jednom případě (10 %) velká forma.

V rámci statistického zhodnocení jsme neprokázali žádnou korelaci mezi počty megakaryocytů v plicním parenchymu a počtem trombocytů v periferní krvi, která byla u všech příjemců nabrána jeden den před transplantací v rámci stanovení krevního obrazu při předoperačním vyšetření. Obdobně vyšetřená krev před odběrem orgánů nebyla u kontrolní skupiny dárců k dispozici. Významnou korelaci jsme neodhalili ani mezi počtem plicních megakaryocytů a tíží daných plicních chorob objektivizovaných prostřednictvím průměrné hodnoty krevního tlaku v plicnici (u všech skupin příjemců), FVC (u restrikčních chorob) a FEV_1 (u obstrukčních chorob).

5 DISKUZE

5.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh

Tato práce vychází z poznatků švédských průkopníků UTx, kteří jako dosud jedinou spolehlivou a bezpečnou metodu k časné detekci rejekčních změn označili histopatologické vyšetření materiálu z ektocervikální biopsie (Brännström et al., 2014). U uterinních graftů se konkrétně hodnotí přítomnost akutní celulární rejekce, která představuje zatím jedinou spolehlivě prokázanou formu manifestované alogenní reakce (Chmel et al., 2019). Jedinými výjimkami byly ojedinělé případy popisující výskyt protrahované smíšené celulární a suspektní humorální rejekce u pacientek s uterinním alograftem (Agarwal et al., 2022; Flyckt et al., 2020). V jednom případě byla taková rejekce zaléčena opakovaným podáním thymoglobulinu (Flyckt et al., 2020). Žádná jiná data ohledně existence humorální rejekce uterinních graftů nejsou dosud známa a tato oblast vyžaduje další studie.

5.1.1 Charakteristika cervikálních lymfocytárních infiltrátů a význam borderline změn

V našem experimentu jsme histopatologicky a imunohistochemicky mapovali lymfocytární populace v rámci ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh premenopauzálních žen a nálezy korelovali s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh (Mölne et al., 2017). Obrazy připomínající borderline až rejekční změny z daného systému hodnocení rejekce byly zaznamenány v 90,4 % ektocervikálních biopsií premenopauzálních žen s vlastní dělohou. Nálezy se podobaly jak na morfologické, tak imunohistochemické úrovni. Žádná předchozí studie zatím nepopsala histopatologický charakter ani imunoprofil lymfocytárních populací v ektocervixu ve vztahu k rejekčním změnám transplantovaných děloh. Pouze v nedávno publikované práci zabývající se histopatologickým vyšetřením sedmi uterinních explantátů, byly v jedné děloze ze šesti kontrolních případů popsány „fokální zánětlivé změny v ektocervixu připomínající borderline obraz“ (Broecker et al., 2021) a obdobné zánětlivé změny byly v další čerstvé studii označeny jako „pseudorejekční“ (Agarwal et al., 2022). Ačkoli tyto nálezy jsme v rámci naší práce popsali u většiny děloh z kohorty 54 žen, je v budoucnu nutné ověření těchto nálezů na větších souborech premenopauzálních žen s vlastní dělohou, které neužívají žádný typ léků ovlivňujících stav imunity.

Diagnózu posttransplantační uterinní rejekce v současnosti stanovuje patolog prostřednictvím histopatologického vyšetření ektocervikální biopsie provedené v několika pravidelných intervalech před početím a několikrát během gravidity (Brännström et al., 2015, 2014; Brucker et al., 2020; Chmel et al., 2019; Ejzenberg et al., 2019). V případě diagnózy borderline změn je obvykle indikována ektocervikální re-biopsie. Opakování bioptického odběru ale může vést k prodloužení intervalu do embryotransferu kvůli nutnosti počkat na zhojení post-bioptických defektů děložního čípku. Protokol odběru cervikálních biopsií přitom musí být přísně dodržován nehledě na načasování embryotransferu (Putman et al., 2021). Navíc, přestože samotná ektocervikální biopsie je díky přerušené senzitivní inervaci transplantované dělohy prakticky nebolestivá, zvyšuje se častým opakováním cervikálních bioptických odběrů riziko komplikací a diskomfort příjemkyň uterinního graftu, což by mohlo vyvolávat otázky o využitelnosti UTx coby nové terapeutické metody stran její efektivity a bezpečnosti.

Grading orgánových rejekčních změn obecně slouží k bezprostřednímu odhalení zánětlivých projevů alogenní reakce, jež by mohly vést k selhání transplantovaného orgánu, který je buď životně důležitý (jako srdce či plíce), nebo zvyšující kvalitu života (jako např tvář, končetiny či děloha). Grade 0 zpravidla v daných systémech označuje normální nález bez rejekce. Bylo by předčasné tvrdit, že borderline kategorie z provizorního skórovacího systému rejekčních změn v ektocervikálních biopsiích transplantovaných dělohy odpovídá také normálnímu nálezu, stejně jako grade 0, ačkoli to výsledky naší práce naznačují (Balko et al., 2022a, 2022b). Na druhou stranu, byl morfologický obraz borderline kategorie kromě premenopauzálních žen s vlastní dělohou popsán i u příjemkyň uterinního graftu s klinickými známkami rejekčního poškození (Broecker et al., 2021). Je tudíž třeba tyto nálezy nejprve ověřit na větších kohortách pacientek a do té doby borderline kategorii ponechat s přihlédnutím k tomu, že se jedná pouze o „zánětlivé změny nejistého významu“, které není třeba řešit podáváním imunosupresivní antirejekční terapie. Stejný terapeutický postup navíc navrhují i recentně publikované práce (Agarwal et al., 2022; Kudose et al., 2022).

5.1.2 Imunohistochemický profil cervikálních lymfocytárních infiltrátů

Pro imunohistochemické mapování lymfocytárních populací v ektocervixu a endocervixu jsme sestavili podobný panel protilátek, jaký je využívaný v ověřování rejekčních změn u řady jiných transplantovaných orgánů (např. plic, srdce a ledvin). Jednalo se o protilátky proti markerům CD45RO, CD8, CD4, CD20 a C4d. Imunohistochemická analýza

lymfocytárních populací ektocervixu potvrdila, že většinu zánětlivých elementů tvoří aktivované T-lymfocyty (v naší studii ve všech případech prokázané expresí imunohistochemického markeru CD45RO). Obdobný nález byl potvrzen v normálním děložním čípku (Poppe et al., 1998) i v ektocervixu uterinních graftů (Mölne et al., 2017). Výsledky tedy ukazují velmi podobný imunoprofil lymfocytárních infiltrátů v netransplantovaných dělohách jako u rejekčních infiltrátů uterinních graftů. Detailní imunohistochemická charakteristika rejekčních infiltrátů byla popsána i v rámci jiných orgánových transplantací, např. LTx (de Blic et al., 1992). Některé práce ukázaly, že u rejekce bývá poměrně typická převaha T-lymfocytů nad B-buňkami, navíc s vyšším poměrem CD8 pozitivních cytotoxických buněk nad CD4 pozitivními helpery (Cheng et al., 2013; Gelman et al., 2008). Obdobné zastoupení těchto buněk bylo patrné i v ektocervixu většiny pacientek z naší kohorty. Rozpoznat v ektocervixu nerejekční lymfocytární infiltráty od hraničně rejekčních je tudíž kromě histopatologické morfologie nemožné i na úrovni exprese proteinů.

Část studovaných lymfoidních buněk nebyla pozitivní ani v jednom ze základních lymfocytárních markerů (CD20, CD8 a CD4) – tyto buňky by mohly odpovídat NK-buňkám, NK/T či Treg lymfocytům, jejichž imunohistochemický profil však nebyl v rámci experimentu vyšetřován. Navržený panel vyšetřovaných imunohistochemických markerů by tedy mohl být rozšířen o další protilátky, zejména cíleným na antigen CD56 coby marker především NK-buněk.

Přestože ani na imunohistochemické úrovni nelze prostřednictvím základních markerů odlišit fyziologické lymfocytární infiltráty ektocervixu od hraničních celulárních rejekčních změn uterinních graftů, lze tak učinit u vyšších stupňů rejekce. Zde jsou totiž lymfocyty v infiltrátech doprovázeny i jinými zánětlivými buňkami a morfologicky patrnými regresivními změnami, které pomohou správnou diagnózu určit. Mezi takové změny se řadí edém stromatu a regrese ektocervikální výstelky, konkrétně apoptózy keratinocytů až redukce šíře epitelu a případné ulcerace (Mölne et al., 2017). Nově se navrhuje zohlednit i perivaskulární zánětlivé změny a defekty kapilár s následným krvácením do intersticia (Agarwal et al., 2022; Kudose et al., 2022).

Odlišení rejekce od nehnisavých zánětů infekční (virové) či autoimunitní etiologie je v transplantační medicíně obecně problematické, a kromě histopatologie vyžaduje

multidisciplinární řešení se zhodnocením klinického nálezu a vyšetřeními i jinými metodami (mikrobiologie, sérologie atd.).

5.1.3 Rozdíly mezi ektocervikálními a endocervikálními nálezy

Ke správné interpretaci ektocervikálních biopsií je v každém případě nutné dodržovat optimální techniku i místo odběru vzorků podle stanovených protokolů. Výsledky naší práce totiž ukazují, že existují významné rozdíly mezi lymfocytárními populacemi ektocervixu a endocervixu. V endocervikálním intersticiu byly v naší kohortě premenopauzálních žen s netransplantovanou dělohou prokázány lymfocytární infiltráty, které v navrženém semikvantitativním skórovacím systému dosahovaly vyšších kategorií v porovnání s ektocervikálními odběry. Vzhledem k doporučovanému odběru ektocervikálních biopsií z oblastí poblíž transformační zóny a endocervikálního kanálu (Mölne et al., 2017) ale mohou být v získaném materiálu snadno zastiženy i úseky endocervixu. Pak hrozí riziko nesprávné interpretace zde přítomných nápadnějších lymfocytárních infiltrátů coby rejekčních změn a to včetně jejich vyšších stupňů. Stát se tak může při hodnocení úseků stromatu endocervixu bez zastižených endocervikálních žlázek/krypt či povrchového epitelu. Předcházet tomuto diagnostickému omylu lze především co nejpřesnějším odběrem ektocervikální biopsie, který vyžaduje zapojení zkušeného gynekologa a ideálně využití kolposkopické kontroly. Tento postup umožňuje identifikovat optimální místo bioptického odběru i minimalizovat riziko neadekvátního samplingu např. z jizvy po přechozí biopsii. Naše práce však nabízí řešení i pro případy, kdy už k nevhodnému odběru došlo a v materiálu se nachází pouze endocervikální stroma s hojnými lymfocyty. Ty totiž mohou být odlišeny imunohistochemicky, protože jak patrno z výsledků našeho mapování lymfocytů, v endocervixu se nacházejí četné CD20 pozitivní B-buňky, které jsou v ektocervixu zastiženy pouze vzácně.

5.1.4 Role menstruačního cyklu na cervikální lymfocytární populace

Ačkoli poměr cervikálních biopsií nabraných v proliferační (n = 26) a sekreční fázi (n = 28) menstruačního cyklu byl téměř vyrovnaný, meziskupinové srovnání nepotvrdilo vliv menstruace na celulární zánětlivé infiltrátu v ektocervixu co do jejich kvality ani kvantity, obdobně jako to naznačuje i jiná studie (Poppe et al., 1998).

5.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci

5.2.1 Výzkumné využití bioptického materiálu z LTx programu

V rámci tohoto experimentu jsme využívali unikátní bioptický materiál z transplantačního programu plic, který oproti jiným vzorkům skýtá řadu výhod a nabízí možnosti vyšetření, která u jiných typů odběrů tkání nejsou možná. Explantáty plic příjemců se množstvím biologického materiálu vyrovnají jednostranné či častěji dokonce oboustranné pneumektomii. Navíc indikace, které k nim vedou, se v jiných situacích zpravidla chirurgicky neřeší. Proto je v rámci LTx možné získat a vyšetřit velké množství terminálně poškozeného plicního parenchymu, který by jinak byl u živých pacientů dostupný maximálně v podobě milimetrových vzorků odebraných prostřednictvím transbronchiální biopsie či kryobiopsie. Na rozdíl od nekroptického materiálu je u plicních explantátů příjemců navíc minimalizováno riziko autolýzy okamžitou pooperační formolovou fixací. Z výzkumného hlediska je tak možné studium různých plicních chorob, zejména restrikčního, obstrukčního či vaskulárního charakteru, které představují hlavní indikace k provedení LTx.

Obdobně existuje v rámci LTx programu i možnost obdržet nepoškozené plíce dárců v množství materiálu odpovídajícímu plicní lobektomii (v případě „oversized“ plic) či jednostranné pneumektomii (v případech SLTx). Ačkoli tyto plíce pochází z kadaverů po mozkové smrti, tak byly vyšetřeny a vyhodnoceny jako dostatečně zdravé a vhodné pro LTx. I přes svůj kadaverózní původ také nejsou příliš zatíženy autolýzou, protože po odběru z těla dárce jsou okamžitě propláchnuty prezervačním roztokem (Perfadex) a doba jejich studené ischemie nesmí překročit osm hodin. V případě, že nejsou během chirurgického výkonu využity, např. z důvodu přílišné velikosti vůči hrudní dutině příjemce či při SLTx, jsou chirurgicky redukovány. Resekované části (zpravidla lingula levé plíce a střední lalok pravé plíce; v případě SLTx celé plicní křídlo) jsou ihned fixovány ve formolu, čímž je opět eliminováno riziko jejich autolytického znehodnocení. Z těchto důvodů představují explantáty z transplantačního programu optimální zdroj tkání pro výzkumné účely a byly v rámci této práce využity ke studiu primárních plicních chorob vedoucích k nutnosti LTx. Daný postup sliboval přesnější výsledky, než podobné předchozí studie provedené na nekroptickém materiálu s vyšším rizikem autolytických změn (Sharma and Talbot, 1986; Soares, 1992).

5.2.2 Průměrné počty plicních megakaryocytů

Tato studie byla primárně zaměřena na mapování plicních megakaryocytů v explantátech plic příjemců indikovaných k LTx. Jako kontrolní skupinu jsme vybrali relativně „zdravé" plicní explantáty kadaverózních dárců bez prokázaného plicního onemocnění. Plicní megakaryocyty jsme zvolili, protože jsme ve starších studiích narazili na možnou spojitost mezi jejich abnormální funkcí a vaskulárními chorobami (Brown and Martin, 1994; Mandal et al., 2007; Martin et al., 1983). Námi naměřené hodnoty počtu plicních megakaryocytů vykazovaly značnou interindividuální variabilitu. I přesto jsme vypozorovali určité tendence k odlišnému průměrnému počtu plicních megakaryocytů mezi jednotlivými skupinami pacientů. Tento nález se následně podařilo podpořit průkazem statisticky významných rozdílů mezi všemi třemi kohortami příjemců a kontrolní skupinou dárců. Průměrný počet daných buněk v plicích kadaverózních dárců byl mírně vyšší (konkrétně 33,55 megakaryocytů/cm^2) než v předchozích studiích (Sharma and Talbot, 1986; Soares, 1992) – snad právě z důvodů minimalizace autolytických změn díky využití LTx materiálu.

5.2.3 Plicní megakaryocyty příjemců s vaskulárními plicními chorobami

Nejvyšší průměrný počet plicních megakaryocytů jsme naměřili v kohortě příjemců s diagnózami vaskulárních plicních chorob, který dosáhl hodnoty 225 megakaryocytů/cm^2. V případě, že byli v dané skupině vyšetřeni izolovaně pacienti s IPAH, se tato hodnota ještě zvýšila na počet 264,5 megakaryocytů/cm^2. Oproti populaci dárců jde o statisticky významný rozdíl ($p = 0{,}021$), který byl ještě výraznější při porovnání s ostatními skupinami příjemců, u kterých byly hladiny plicních megakaryocytů nižší než v kohortě dárců. Kromě kvantitativních odlišností jsme zastihli i kvalitativní rozdíly plicních megakaryocytů u jedinců s vaskulárními plicními lézemi. Zejména tendence ke shlukování až tvorbě aglomerátů daných buněk a jejich nápadně větší velikosti, respektive častějšímu nálezu velkých forem (u 70 % pacientů). U jiných kohort nebylo shlukování megakaryocytů patrné v žádném z případů a nález cytomorfologicky velkých forem byl vzácný.

Nápadné rozdíly v počtu, morfologii i distribuci plicních megakaryocytů ve vzorcích IPAH pacientů vyvolávají podezření, že by se tyto buňky mohly podílet na etiopatogenezi zmíněné choroby, obzvláště přihlédneme-li k jejich uvedené roli v tvorbě destiček (Lefrançais et al., 2017; Levine et al., 2009; Martin et al., 1983; Pedersen, 2009; Trowbridge et al., 1982). Tuto tezi podporují nedávné důkazy o klíčové roli destiček při vzniku plicní hypertenze (Kazimierczyk et al., 2019; Kazimierczyk and Kamiński, 2018; Zanjani, 2012). Některé

nedávné studie dále ukázaly, že nejen cytokinové produkty destiček mohou zapříčinit přestavbu plicních arterií (Humbert et al., 1998; Zheng et al., 2015), ale také že trombogenezi a angiogenezi dokáží iniciovat i některé produkty megakaryocytů. Jedná se konkrétně o protrombogenní a proangiogenní faktory jakými jsou např. von Willebrandův faktor, vaskulární endoteliální růstový faktor A, fibroblastový růstový faktor 2, epidermální růstový faktor, destičkový růstový faktor a metalopeptidáza 9 (Andrae et al., 2008; Humbert et al., 1998; Italiano et al., 2008; Lee et al., 2007; Rhee et al., 2004; Salven et al., 1999; Zanjani, 2012). Hladina von Willebrandova faktoru bývá u IPAH pacientů dokonce zvýšena (Collados et al., 1999).

Případná porucha fragmentace cytoplazmy megakaryocytů by pak možná dokázala vysvětlit častý výskyt velkých forem těchto buněk v tak vysokých počtech v plicním parenchymu IPAH pacientů, jako jsme popsali v naší studii. Data podporující myšlenku o poruše tvorby destiček z megakaryocytů lze najít ve studii, která naznačuje, že u IPAH pacientů dochází k jejich zvýšené obměně (Kéreveur et al., 2000). Navíc podobné abnormality v počtu, morfologii a distribuci megakaryocytů lze detekovat u myelodysplázií a myeloproliferativních chorob kostní dřeně, která představuje primární rezervoár megakaryocytární řady. Pro některé z těchto poruch kostní dřeně je dokonce obdobné shlukování megakaryocytů v drobné klastry typické. Pro potvrzení těchto hypotéz je však zapotřebí získat obsáhlejší množství dat na větších kohortách pacientů.

Faktorem svědčícím proti prostému střádání megakaryocytů v plicních cévách postižených IPAH je průkaz těchto buněk v lumen kapilár interalveolárních sept, kde byly detekovány ve všech případech. V tomto místě se dané buňky nemohou pouze hromadit vlivem zúženého lumen arterií, protože kapilární řečiště se nachází až za stenotizovanými tepnami, kterými tedy megakaryocyty musely nejprve projít, aby se dostaly až do kapilár interalveolárních sept. Zvýšený počet plicních megakaryocytů tudíž nelze vysvětlit prostou prestenotickou stázou krve, ve které by byly obsaženy.

5.2.4 Plicní megakaryocyty příjemců s restrikčními a obstrukčními plicními chorobami

Ve zbývajících skupinách LTx příjemců byl průměrný počet plicních megakaryocytů v porovnání s kontrolní skupinou dárců nižší. Nejnižší byl u pacientů s restrikčními chorobami plic (5,8 buněk/cm^2) a o něco vyšší u pacientů s obstrukčními chorobami plic (11,9 buněk/cm^2). Oba rozdíly byly vůči kontrolní skupině prokázány jako statisticky

významné s $p < 0,0001$ (restrikční plicní nemoci) a $p < 0,001$ (obstrukční plicní nemoci). Tyto fenomény lze v obou případech vysvětlit ztrátou funkčního plicního parenchymu, konkrétně interalveolárních sept, ve kterých jsme ve všech případech všech kohort dané buňky prokázali. V rámci restrikčních plicních chorob dochází ke ztrátě těchto struktur vlivem jizevnaté fibrotizace intersticia s jeho rozšířením a splýváním jednotlivých sept. U obstrukčních plicních chorob typu CHOPN se počet interalveolárních sept snižuje destrukčním mechanizmem za vzniku „air-trappingu“ s následnými emfyzematózními změnami charakterizovaným úbytkem stěn alveolů a ve výsledku sníženým povrchem plic.

5.2.5 Silné a slabé stránky experimentu

Tato studie má určité limitace – analyzuje poměrně malé skupiny pacientů a k potvrzení obdržených dat je zapotřebí dalších studií na větších kohortách. Určitý nedostatek by bylo možné vidět i v propláchnutí dárcovských plic prezervačním roztokem (Perfadex), který by mohl zkreslit skutečné počty intravaskulárních buněčných populací. Avšak i přes aplikaci zmíněného roztoku nebyl při histopatologickém vyšetření v cévách patrný žádný rozdíl v množství buněk vůči plicím příjemců ani na mikroskopické úrovni. Dále je také jasné, že dárcovské plíce nemohou být považovány za absolutně zdravé, jelikož pochází od kadaverózních dárců po mozkové smrti, během které dochází k endoteliálnímu poškození a zvýšené permeabilitě plicních kapilár se vznikem neurogenního edému plic (Busl and Bleck, 2015).

Naše práce má ale i řadu silných stránek. Podle našich poznatků se jedná o první studii, popisující populace plicních megakaryocytů na základě lidského bioptického materiálu, v tomto případě získaného v rámci LTx programu. Díky tomu bylo možné studovat histopatologicky rozsáhlou plochu plicního parenchymu (cm^2) ovlivněného variabilními chorobami bez jakéhokoli přidaného rizika pro pacienty. Získat takové množství plicního parenchymu jinými typy bioptického odběru není prakticky možné. Předchozí obdobné studie využívaly pro stejný účel myších modelů (Yeung et al., 2020) či nekroptických vzorků (Sharma and Talbot, 1986; Soares, 1992).

Nejvýznamnějším výsledkem této části naší práce je, že popisuje značně odlišné hladiny plicních megakaryocytů na základě definovaných primárních plicních postižení a zřetelně ukazuje kvantitativní a kvalitativní abnormity u IPAH pacientů. Tyto výsledky korelují

s nedávnými důkazy o roli destiček při rozvoji plicní hypertenze (Kazimierczyk et al., 2019; Kazimierczyk and Kamiński, 2018; Zanjani, 2012).

6 ZÁVĚR

V naší práci ukazujeme důležitost histopatologického vyšetření v transplantačním programu, které dodnes nebylo zcela nahrazeno žádnou jinou metodou k diagnostice rejekce orgánových štěpů. Hodnocení rejekčních změn zpravidla vychází z mezinárodně ustanovených skórovacích systémů, které jsou průběžně aktualizovány odbornými společnostmi. V naší práci uvádíme data, která lze využít ke změně zatím provizorního skórovacího systému relativně nové metody transplantace dělohy. V rámci zpřesnění tkáňové diagnostiky uterinních graftů navíc představujeme i imunohistochemický znak použitelný k odlišení pseudorejekčních infiltrátů endocervixu.

Kromě průkazu rejekce v darovaném orgánu může patolog přispět i nálezem morfologických znaků v orgánu příjemce, které mohou pomoci osvětlit etiopatogenezi primárních onemocnění, která vedla k potřebě transplantace. V naší práci jsme odhalili potencionální etiologický faktor u idiopatické plicní hypertenze.

Obě dvě části práce přesáhly očekávané cíle a naplnily stanovené hypotézy, čímž ozřejmily nové poznatky v tkáňové diagnostice dárců i příjemců, navíc hned ve dvou různých orgánových transplantačních programech. Tyto nálezy by mohly vést k přesnější histopatologické diagnostice pacientů v transplantačním programu, od které se odvíjí celá následná péče, zejména pak management rejekce graftu. Celkově jsou výsledky experimentů provedených v rámci této práce podnětem k dalším studiím na větších kohortách pacientů, které by mohly jejich výsledky jednoznačně potvrdit.

7 SHRNUTÍ

7.1 Experiment 1: Histopatologická analýza ektocervikálních biopsií netransplantovaných děloh a korelace nálezů s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn transplantovaných děloh

Podle našich poznatků je tato prospektivní nerandomizovaná studie první prací srovnávající histopatologické a imunohistochemické nálezy v ektocervikálních biopsiích premenopauzálních žen s provizorním skórovacím systémem rejekčních změn uterinních graftů. V této práci jsme prokázali překryvný histopatologický a imunohistochemický obraz ektocervikálních lymfocytárních infiltrátů s borderline kategorií zmíněného provizorního skórovacího systému rejekce používaného v předchozích UTx studiích. Tento nález naznačuje, že podávání imunosupresivní terapie pacientkám s transplantovanou dělohou není v případě diagnózy borderline změn nutné. Také tím vyvstává otázka, zda je v těchto případech nutná re-biopsie uterinního graftu, která vede k prodloužení doby do embryotransferu. K případnému definitivnímu zrušení borderline kategorie ze skórovacího systému rejekčních změn je však zapotřebí potvrzení daných výsledků na větší kohortě pacientek.
Naše studie zároveň přispívá ke zpřesnění tkáňové diagnostiky uterinních graftů nálezem užitečného diagnostického znaku, který umožňuje identifikovat neadekvátně odebrané struktury endocervixu v materiálu z ektocervikální biopsie. Ve stromatu endocervixu jsme totiž prokázali výraznější zánětlivé změny, na kterých se však oproti ektocervixu výrazněji podílí i B-lymfocyty.

7.2 Experiment 2: Mapování plicních megakaryocytů v explantovaných plicích po transplantaci

Tato studie se zaměřila na mapování plicních megakaryocytů v plicích LTx dárců bez předchozího plicního onemocnění a LTx příjemců s různými plicními chorobami. Pacienti trpící idiopatickou plicní arteriální hypertenzí (IPAH) vykazovali morfologické odlišnosti a výrazně vyšší počty plicních megakaryocytů, které se ukázaly být statisticky významné v porovnání se všemi ostatními skupinami. Tento nález by mohl přispět k objasnění původu vazokonstrikce, trombotizace a cévní přestavby plicního řečiště – tj. všech základních

mechanizmů vedoucích k rozvoji IPAH, jelikož u řady produktů destiček a megakaryocytů roste podezření, že jsou schopny tyto procesy vyvolávat.

8 SUMMARY

8.1 Experiment 1: Histopathological analysis of the ectocervical biopsy in non-transplanted uteri and correlation of the results to the provisional scoring system of subclinical graft rejection after uterus transplantation

To our knowledge, this prospective non-randomized study was the first to assess the histopathological and immunohistochemical findings of ectocervical biopsies in premenopausal women in relation to the provisional scoring system of rejection changes in transplanted uteri. Our study showed similar histopathological and immunohistochemical findings to the borderline category of the above mentioned scoring system of rejection used in previous UTx studies. This implies that there is no need to administer immunosuppressive therapy to the patients with a diagnosis of borderline changes of their uterine graft. It also raises a question whether it is necessary to perform re-biopsy in such cases, which would prolong the time before embryo-transfer. However, similar studies are required to validate our findings before this category is fully eliminated.
Furthermore, due to the immunohistochemical mapping of the lymphocytic populations, this study also provides a useful diagnostic tool on how to identify inadequate endocervical samples, which could raise uncertainty during histopathological evaluation of the cervical biopsy. As it has been proven, there are striking inflammatory changes with numerous B-lymphocytes within the endocervix compared to the ectocervix.

8.2 Experiment 2: Mapping of the pulmonary megakaryocytes in explanted lungs after transplantation

This study focused on mapping of the pulmonary megakaryocytes among LTx donor lungs without any previous pulmonary disease and LTx recipients suffering from different pulmonary disorders. Patients suffering from idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) showed morphological differences and strikingly higher and statistically validated counts of the lung's megakaryocytes compared to all the other groups. Such finding could contribute to the understanding of the origin of vasoconstriction, thrombosis and vascular remodelling of the pulmonary circulation – all the basic mechanisms leading to the development of IPAH, as for there is increasing evidence of several products of platelets and megakaryocytes to be capable of triggering such processes.

9 LITERATURA

Agarwal, A., Johannesson, L., Findeis, S.K., Punar, M., Askar, M., Ma, T.-W., Pinto, K., et al. (2022). Clinicopathological analysis of uterine allografts including proposed scoring of ischemia reperfusion injury and T-cell-mediated rejection-Dallas uterus transplant study: A pilot study. *Transplantation* 106, 167–177.

Aigner, C., Jaksch, P., Taghavi, S., Wisser, W., Marta, G., Winkler, G., Dekan, G., et al. (2005). Donor total lung capacity predicts recipient total lung capacity after size-reduced lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 24, 2098–2102.

Andrae, J., Gallini, R., Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22, 1276–1312.

Balko, J., Nováčková, M., Škapa, P., Pastor, Z., Chmel, R., Zámečník, J., Chmel, R. (2022a). Histopathological examination of the ectocervical biopsy in non-transplanted uteri: A study contributing to the provisional scoring system of subclinical graft rejection after uterus transplantation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 101, 37–45.

Balko, J., Zámečník, J., Chmel, R. (2022b). Transplantace dělohy v léčbě ženské neplodnosti z pohledu patologa. *Cesk Patol* 58, 57–60.

Brännström, M., Dahm Kähler, P., Greite, R., Mölne, J., Díaz-García, C., Tullius, S.G. (2018). Uterus transplantation: A rapidly expanding field. *Transplantation* 102, 569–577.

Brännström, M., Johannesson, L., Bokström, H., Kvarnström, N., Mölne, J., Dahm-Kähler, P., Enskog, A., et al. (2015). Livebirth after uterus transplantation. *Lancet* 385, 607–616.

Brännström, M., Johannesson, L., Dahm-Kähler, P., Enskog, A., Mölne, J., Kvarnström, N., Diaz-Garcia, C., et al. (2014). First clinical uterus transplantation trial: a six-month report. *Fertil Steril* 101, 1228–1236.

Bravo, C., Roldán, J., Roman, A., Degracia, J., Majo, J., Guerra, J., Monforte, V., et al. (2005). Tuberculosis in lung transplant recipients. *Transplantation* 79, 59–64.

Broecker, V., Brännström, M., Ekberg, J., Dahm-Kähler, P., Mölne, J. (2021). Uterus transplantation: Histological findings in explants at elective hysterectomy. *Am J Transplant* 21, 798–808.

Brown, A.S., Martin, J.F. (1994). The megakaryocyte platelet system and vascular disease. *Eur J Clin Invest* 24, 9–15.

Brucker, S.Y., Strowitzki, T., Taran, F.-A., Rall, K., Schöller, D., Hoopmann, M., Henes, M., et.al. (2020). Living-Donor uterus transplantation: Pre-, intra-, and postoperative parameters relevant to surgical success, pregnancy, and obstetrics with live births. *J Clin Med* 9, 2485.

Busl, K.M., Bleck, T.P. (2015). Neurogenic Pulmonary Edema. *Crit Care Med* 43, 1710–1715.

Chadimová, M., Kodetová, D., Lischke, R., Šimonek, J., Pozniak, J., Pafko, P. (2015). Transplantace plic v České republice – z pohledu patologa. *Cesk Patol* 51, 175–180.

Chambers, D.C., Yusen, R.D., Cherikh, W.S., Goldfarb, S.B., Kucheryavaya, A.Y., Khusch, K., Levvey, B.J., et al. (2017). The registry of the International society for heart and lung transplantation: Thirty-fourth adult lung and heart-lung transplantation report-2017; Focus theme: Allograft ischemic time. *J Heart Lung Transplant* 36, 1047–1059.

Cheng, L., Guo, H., Qiao, X., Liu, Q., Nie, J., Li, J., Wang, J., et al. (2013). T cell immunohistochemistry refines lung transplant acute rejection diagnosis and grading. *Diagn Pathol* 8, 168.

Chmel, R., Čekal, M., Pastor, Z., Chmel, R., Paulasová, P., Havlovicová, M., Macek, et al. (2020a). Assisted reproductive techniques and pregnancy results in women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome undergoing uterus transplantation: The Czech experience. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 33, 410–414.

Chmel, R., Nováčková, M., Čekal, M., Chmel, R., Pastor, Z. (2021). Current ethical aspects of absolute uterine factor infertility treatment using uterus transplantation. *Ceska Gynekol* 86, 40–45.

Chmel, R., Nováčková, M., Janoušek, L., Matěcha, J., Pastor, Z., Malušková, J., Čekal, M., et al. (2019). Revaluation and lessons learned from the first 9 cases of a Czech uterus transplantation trial: Four deceased donor and 5 living donor uterus transplantations. *Am J Transplant* 19, 855–864.

Chmel, R., Nováčková, M., Pastor, Z. (2020b). Lessons learned from the Czech uterus transplant trial related to surgical technique that may affect reproductive success. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 60, 625–627.

Chmel, R., Nováčková, M., Pastor, Z., Froněk, J. (2018). The interest of women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome and laparoscopic Vecchietti neovagina in uterus transplantation. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 31, 480–484.

Collados, M.T., Sandoval, J., López, S., Massó, F.A., Páez, A., Borbolla, J.R., Montaño, L.F. (1999). Characterization of von Willebrand factor in primary pulmonary hypertension. *Heart Vessels* 14, 246–252.

Dahm-Kähler, P., Diaz-Garcia, C., Brännström, M. (2016). Human uterus transplantation in focus. *Br Med Bull* 117, 69–78.

de Blic, J., Peuchmaur, M., Carnot, F., Danel, C., Deruesne, M., Reynaud, P., Scheinmann, et al. (1992). Rejection in lung transplantation--an immunohistochemical study of transbronchial biopsies. *Transplantation* 54, 639–644.

de Jesus Peixoto Camargo, J., Marcantonio Camargo, S., Marcelo Schio, S., Noguchi Machuca, T., Adélia Perin, F. (2008). Hyperacute rejection after single lung transplantation: a case report. *Transplant Proc* 40, 867–869.

de Vito Dabbs, A., Hoffman, L.A., Iacono, A.T., Zullo, T.G., McCurry, K.R., Dauber, J.H. (2004). Are symptom reports useful for differentiating between acute rejection and pulmonary infection after lung transplantation? *Heart Lung* 33, 372–380.

Ejzenberg, D., Andraus, W., Baratelli Carelli Mendes, L.R., Ducatti, L., Song, A., Tanigawa, R., Rocha-Santos, V., et al. (2019). Livebirth after uterus transplantation from a deceased donor in a recipient with uterine infertility. *Lancet* 392, 2697–2704.

Fageeh, W., Raffa, H., Jabbad, H., Marzouki, A. (2002). Transplantation of the human uterus. *Int J Gynaecol Obstet* 76, 245–251.

Flyckt, R., Falcone, T., Quintini, C., Perni, U., Eghtesad, B., Richards, E.G., Farrell, R.M., et al. (2020). First birth from a deceased donor uterus in the United States: from severe graft rejection to successful cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol* 223, 143–151.

Folch, M., Pigem, I., Konje, J.C. (2000). Müllerian agenesis: etiology, diagnosis, and management. *Obstet Gynecol Surv* 55, 644–649.

Frost, A.E., Jammal, C.T., Cagle, P.T. (1996). Hyperacute Rejection Following Lung Transplantation. *Chest* 110, 559–562.

Gelman, A.E., Okazaki, M., Lai, J., Kornfeld, C.G., Kreisel, F.H., Richardson, S.B., Sugimoto, S., et al. (2008). CD4+ T lymphocytes are not necessary for the acute rejection of vascularized mouse lung transplants. *J Immunol* 180, 4754–4762.

Glanville, A.R., Verleden, G.M., Todd, J.L., Benden, C., Calabrese, F., Gottlieb, J., Hachem, R.R., et al. (2019). Chronic lung allograft dysfunction: Definition and update of restrictive allograft syndrome-A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant* 38, 483–492.

Haas, M., Sis, B., Racusen, L.C., Solez, K., Glotz, D., Colvin, R.B., Castro, M.C.R., et al. (2014). Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 14, 272–283.

Hachem, R.R. (2012). Antibody-mediated lung transplant rejection. *Curr Respir Care Rep* 1, 157–161.

Hachem, R.R. (2011). Antibodies to human leukocyte antigens in lung transplantation. *Clin Transpl* 327–332.

Hachem, R.R., Khalifah, A.P., Chakinala, M.M., Yusen, R.D., Aloush, A.A., Mohanakumar, T., Patterson, G.A., et al. (2005). The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. *Transplantation* 80, 1406–1413.

Hardy, J., Webb, W., Dalton, M., Walker, G. (1963). Lung homotransplantation in man. *JAMA* 186, 1065–1074.

Hopkins, P.M., Aboyoun, C.L., Chhajed, P.N., Malouf, M.A., Plit, M.L., Rainer, S.P., Glanville, A.R. (2004). Association of minimal rejection in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1022–1026.

Humbert, M., Monti, G., Fartoukh, M., Magnan, A., Brenot, F., Rain, B., Capron, F., et al. (1998). Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J* 11, 554–559.

Husain, A.N., Siddiqui, M.T., Holmes, E.W., Chandrasekhar, A.J., McCabe, M., Radvany, R., Garrity, E.R. (1999). Analysis of risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 829–833.

Italiano, J.E., Richardson, J.L., Patel-Hett, S., Battinelli, E., Zaslavsky, A., Short, S., Ryeom, S., et al. (2008). Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released. *Blood* 111, 1227–1233.

Johannesson, L., Testa, G., Putman, J.M., McKenna, G.J., Koon, E.C., York, J.R., Bayer, J., et al. (2021). Twelve live births after uterus transplantation in the Dallas uterus transplant study. *Obstetrics and gynecology* 137, 241–249.

Kazimierczyk, R., Blaszczak, P., Jasiewicz, M., Knapp, M., Ptaszynska-Kopczynska, K., Sobkowicz, B., Waszkiewicz, E., et al. (2019). Increased platelet content of SDF-1alpha is associated with worse prognosis in patients with pulmonary prterial hypertension. *Platelets* 30, 445–451.

Kazimierczyk, R., Kamiński, K. (2018). The role of platelets in the development and progression of pulmonary arterial hypertension. *Adv Med Sci* 63, 312–316.

Kéreveur, A., Callebert, J., Humbert, M., Hervé, P., Simonneau, G., Launay, J.-M., Drouet, L. (2000). High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2233–2239.

Kudose, S., Ratner, L., Batal, I. (2022). Histopathologic grading of uterine allograft rejection: The beginning of a long journey. *Transplantation* 106, 22–23.

Lee, S., Chen, T.T., Barber, C.L., Jordan, M.C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., et al. (2007). Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell* 130, 691–703.

Lefaucheur, C., Nochy, D., Andrade, J., Verine, J., Gautreau, C., Charron, D., Hill, G.S., et al. (2009). Comparison of combination Plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 9, 1099–1107.

Lefrançais, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D.M., Thornton, E.E., et al. (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 544, 105–109.

Levine, D.J., Glanville, A.R., Aboyoun, C., Belperio, J., Benden, C., Berry, G.J., Hachem, R., et al. (2016). Antibody-mediated rejection of the lung: A consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 35, 397–406.

Levine, R.F., Eldor, A., Shoff, P.K., Kirwin, S., Tenza, D., Cramer, E.M. (2009). Circulating megakaryocytes: Delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur J Haematol* 51, 233–246.

Lischke, R., Šimonek, J., Pozniak, J., Schützner, J., Pafko, P. (2011). Transplantace plic. *Rozhl Chir* 90, 612–620.

Lotz, M. (2018). Uterus transplantation as radical reproduction: Taking the adoption alternative more seriously. *Bioethics* 32, 499–508.

Mandal, R. v., Mark, E.J., Kradin, R.L. (2007). Megakaryocytes and platelet homeostasis in diffuse alveolar damage. *Exp Mol Pathol* 83, 327–331.

Martin, J.F., Slater, D.N., Bridge, Trowbridge, E.A. (1983). Abnormal intrapulmonary platelet production: a possible cause of vascular and lung disease. *Lancet* 321, 793–796.

Martinu, T., Chen, D.-F., Palmer, S.M. (2009). Acute rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients. *Proc Am Thorac Soc* 6, 54–65.

Mölne, J., Broecker, V., Ekberg, J., Nilsson, O., Dahm-Kähler, P., Brännström, M. (2017). Monitoring of human uterus transplantation with cervical biopsies: A provisional scoring system for rejection. *Am J Transplant* 17, 1628–1636.

Morrell, M.R., Pilewski, J.M., Gries, C.J., Pipeling, M.R., Crespo, M.M., Ensor, C.R., Yousem, S.A., et al. (2014). De novo donor-specific HLA antibodies are associated with early and high-grade bronchiolitis obliterans syndrome and death after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 33, 1288–1294.

Ofek, E., Sato, M., Saito, T., Wagnetz, U., Roberts, H.C., Chaparro, C., Waddell, T.K., et al. (2013). Restrictive allograft syndrome post lung transplantation is characterized by pleuroparenchymal fibroelastosis. *Mod Pathol* 26, 350–356.

Pafko, P., Schützner, J., Lischke, R., David, I., Špatenka, J. (1999). The first sequential transplantation of both lungs in the Czech Republic. *Rozhl Chir* 78, 235–236.

Parulekar, A.D., Kao, C.C. (2019). Detection, classification, and management of rejection after lung transplantation. *J Thorac Dis* 11, S1732–S1739.

Pedersen, N.T. (2009). Occurrence of megakaryocytes in various vessels and their retention in the pulmonary capillaries in man. *Scand J Haematol* 21, 369–375.

Putman, J.M., Zhang, L., Gregg, A.R., Testa, G., Johannesson, L. (2021). Clinical pregnancy rates and experience with in vitro fertilization after uterus transplantation: Dallas Uterus Transplant Study. *Am J Obstet Gynecol* 225, 155.e1-155.e11.

Rathore, R.S., Mehta, N., Mehta, S.B., Babu, M., Bansal, D., Pillai, B.S., Sam, M.P., et al. (2017). Can zero-hour cortical biopsy predict early graft outcomes after living donor renal transplantation? *Can Urol Assoc J* 11, E437–E440.

Razia, D., Arjuna, A., Trahan, A., Hahn, M.F., Abdelrazek, H., Omar, A., Tokman, S.,et al. (2022). Incidentally detected malignancies in lung explants. *Prog Transplant* 32, 332–339.

Rhee, J.-S., Black, M., Silvia, U., Fischer, S., Morgenstern, E., Hammes, H.-P., Preissner, K. (2004). The functional role of blood platelet components in angiogenesis. *Thromb Haemost* 92, 394–402.

Richards, E.G., Farrell, R.M., Ricci, S., Perni, U., Quintini, C., Tzakis, A., Falcone, T. (2021). Uterus transplantation: state of the art in 2021. *J Assist Reprod Genet* 38, 2251–2259.

Roux, A., Levine, D.J., Zeevi, A., Hachem, R., Halloran, K., Halloran, P.F., Gibault, L., et al. (2019). Banff Lung Report: Current knowledge and future research perspectives for diagnosis and treatment of pulmonary antibody-mediated rejection (AMR). *Am J Transplant* 19, 21–31.

Salvadori, M., Bertoni, E. (2014). What's new in clinical solid organ transplantation by 2013. *World J Transplant* 4, 243–266.

Salven, P., Orpana, A., Joensuu, H. (1999). Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 5, 487–91.

Scheinin, T.M., Koivuniemi, A.P. (1963). Megakaryocytes in the Pulmonary Circulation. *Blood* 22, 82–87.

Sharma, G.K., Talbot, I.C. (1986). Pulmonary megakaryocytes: "missing link" between cardiovascular and respiratory disease? *J Clin Pathol* 39, 969–976.

Soares, F.A. (1992). Increased numbers of pulmonary megakaryocytes in patients with arterial pulmonary tumour embolism and with lung metastases seen at necropsy. *J Clin Pathol* 45, 140–142.

Steen, S., Sjöberg, T., Pierre, L., Liao, Q., Eriksson, L., Algotsson, L. (2001). Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet* 357, 825–829.

Stewart, S., Fishbein, M.C., Snell, G.I., Berry, G.J., Boehler, A., Burke, M.M., Glanville, A., et al. (2007). Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant* 26, 1229–1242.

Sundaresan, S., Mohanakumar, T., Smith, M.A., Trulock, E.P., Lynch, J., Phelan, D., Cooper, J.D., et al. (1998). HLA-A locus mismatches and development of

antibodies to HLA after lung transplantation correlate with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 65, 648–653.

Švorcová, M., Vachtenheim, J., Havlín, J., Jakubec, P., Rakita, D., Balko, J., Šimonek, J., et al. (2022). Transbronchial cryobiopsy vs conventional forceps biopsy in lung transplant recipients multicenter study. *J Heart Lung Transplant* 41, S529–S530.

Swanson, E., Wallace, W.D. (2014). Handling and interpretation of lung transplant biopsies. *Methods Mol Biol* 1180, 293–302.

Testa, G., Koon, E.C., Johannesson, L. (2017). Living donor uterus transplant and surrogacy: Ethical analysis according to the principle of equipoise. *Am J Transplant* 17, 912–916.

Toronto Lung Transplant Group. (1986). Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 314, 1140–1145.

Treede, H., Glanville, A.R., Klepetko, W., Aboyoun, C., Vettorazzi, E., Lama, R., Bravo, C., et al. (2012). Tacrolimus and cyclosporine have differential effects on the risk of development of bronchiolitis obliterans syndrome: results of a prospective, randomized international trial in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 31, 797–804.

Trowbridge, E.A., Martin, J.F., Slater, D.N. (1982). Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes, implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thromb Res* 28, 461–475.

Valente, M., Calabrese, F., Angelini, A., Castiglione, A.G., Rigotti, P., Ragani, M., Torelli, R., et al. (2006). Role of the pathologist in organ transplantation: the North Italy Transplant program experience. *Transplant Proc* 38, 983–985.

Venuta, F., van Raemdonck, D. (2017). History of lung transplantation. *J Thorac Dis* 9, 5458–5471.

Verleden, G.M., Glanville, A.R., Lease, E.D., Fisher, A.J., Calabrese, F., Corris, P.A., Ensor, C.R., et al. (2019). Chronic lung allograft dysfunction: Definition, diagnostic criteria, and approaches to treatment-A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant* 38, 493–503.

Veta, M., van Diest, P.J., Vink, A. (2021). Can automatic image analysis replace the pathologist in cardiac allograft rejection diagnosis? *Eur Heart J* 42, 2370–2372.

Weill, D. (2018). Lung transplantation: indications and contraindications. *J Thorac Dis* 10, 4574–4587.

Witt, C.A., Puri, V., Gelman, A.E., Krupnick, A.S., Kreisel, D. (2014). Lung transplant immunosuppression - time for a new approach? *Expert Rev Clin Immunol* 10, 1419–1421.

Yeung, A.K., Villacorta-Martin, C., Hon, S., Rock, J.R., Murphy, G.J. (2020). Lung megakaryocytes display distinct transcriptional and phenotypic properties. *Blood Adv* 4, 6204–6217.

Yousem, S.A., Berry, G.J., Cagle, P.T., Chamberlain, D., Husain, A.N., Hruban, R.H., Marchevsky, A., et al. (1996). Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *J Heart Lung Transplant* 15, 1–15.

Zanjani, K.S. (2012). Platelets in pulmonary hypertension: a causative role or a simple association? *Iran J Pediatr* 22, 145–157.

Zheng, Y.-G., Yang, T., Xiong, C.-M., He, J.-G., Liu, Z.-H., Gu, Q., Zhao, Z.-H., et al. (2015). Platelet Distribution Width and Mean Platelet Volume in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Heart Lung Circ* 24, 566–572.

10 SEZNAM PUBLIKACÍ

Původní vědecké práce, které jsou podkladem této disertační práce:

Balko, J., Nováčková, M., Škapa, P., Pastor, Z., Chmel, R., Zámečník, J., Chmel, R. (2022). Histopathological examination of the ectocervical biopsy in non-transplanted uteri: A study contributing to the provisional scoring system of subclinical graft rejection after uterus transplantation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 101, 37–45.
IF_{2022} = 4,544 (Q1).

Balko, J., Havlín, J., CasasMendez, F., Zajacová, A., Koblížek, M., Švorcová, M., Lischke, R., Zámečník, J. (2022). Mapping of the lung megakaryocytes: A role in pathogenesis of idiopathic pulmonary arterial hypertension? *Pathol Res Pract* 237, 154060.
IF_{2022} = 3,309 (Q2).

Balko, J., Zámečník, J., Chmel, R. (2022). Transplantace dělohy v léčbě ženské neplodnosti z pohledu patologa. *Cesk Patol* 58, 57–60.
Časopis s recenzním řízením bez impakt faktoru.

Původní vědecké práce, které nejsou podkladem disertační práce:

Balko, J., Staněk, M., Krsková, L., Zámečník, J. (2023). Unusual fusion gene rearrangements in patients with nodular fasciitis: a study of rare and novel USP6 fusion partners with a review of the literature. *J Clin Pathol* jcp-2023-208768.
IF_{2022} = 4,467 (Q1).

Fujiwara, T., Medellin, M.R., Sambri, A., Tsuda, Y., **Balko, J.**, Sumathi, V., Gregory, J., Jeys, L., Abudu, A. (2019). Preoperative surgical risk stratification in osteosarcoma based on the proximity to the major vessels. *Bone Joint J* 101 B, 1024–1031.
IF_{2019} = 4,306 (Q1).

Klocperk, A., Bloomfield, M., Paračková, Z., Zentsová, I., Vrabcová, P., **Balko, J.**, Meseznikov, G., Mendez, L.F.C., Grandcourtová, A., Šípek, J., Tulach, M., Zámečník, J., Vymazal, T., Šedivá, A. (2020). Complex immunometabolic profiling reveals the activation of cellular immunity and biliary lesions in patients with severe COVID-19. *J Clin Med* 9, 3000.
IF_{2020} = 4,242 (Q1).

Tsagozis, P., Gaston, C.L., Haglund, F., **Balko, J.**, Sumathi, V., Grimer, R., Parry, **M.** (2021). The importance of surgical margins in malignant triton tumour of the trunk and extremities. *Oncol Lett* 21, 120.
IF_{2021} = 3,111 (Q3).

Krsková, L., Němečková, T., **Balko, J.**, Brož, P., Vícha, A. (2021). Novel ZEB2-PLAG1 fusion gene identified by RNA sequencing in a case of lipoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 68, e28691.
IF_{2021} = 3,838 (Q1).

Mišove, A., Vícha, A., Zápotocký, M., Mališ, J., **Balko, J.**, Němečková, T., Szabová, J., Kynčl, M., Nováková-Kodetová, D., Štolová, L., Jenčová, P., Brož, P., Krsková, L. (2021). An unusual fusion gene EML4-ALK in a patient with congenital mesoblastic nephroma. *Genes Chromosomes Cancer* 60, 837–840.
IF_{2021} = 4,263 (Q1).

Rousek, M., Whitley, A., Kachlík, D., **Balko, J.**, Záruba, P., Belbl, M., Nikov, A., Ryska, M., Gürlich, R., Pohnán, R. (2022). The dorsal pancreatic artery: A meta-analysis with clinical correlations. *Pancreatol* 22, 325–332.
IF_{2022} = 3,996 (Q1).

Fíková, A., Kuchař, M., Kalfeřt, D., Dostálová, L., **Balko, J.**, Zábrodský, M., Plzák, J. (2022). Experience with follow-up strategy in selected patients with Warthin tumour diagnosed by ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (FNAB). *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* 279, 2049–2055.
IF_{2022} = 2,503 (Q1).

Horák, P., Kreisingerová, K., Réda, J., Ondrušová, L., **Balko, J.**, Vachtenheim Jr, J., Žáková, P., Vachtenheim, J. (2023). The Hedgehog/GLI signaling pathway activates transcription of Slug (Snail2) in melanoma cells. *Oncol Rep* 49, 75.
IF_{2022} = 4,136 (Q2).

Pokorná Klímová, L., Gut, J., Tlustá, P., Zárubová, K., Bronský, J., Zeman, L., Frýbová, B., Soukup, J., **Balko, J.**, Kodetová, D. (2017). Recidivující krvácení do trávicího ústrojí. *Cesk Pediatr* 72, 45–50.
Časopis s recenzním řízením bez impakt faktoru.

Farkašová, M., Procházka, V., Kunovský, L., Eid, M., Vlažný, J., Hustý, J., **Balko, J.**, Kysela, P., Kala, Z. (2021). Multiorgánová resekce pro rozsáhlý paragangliom kazuistika. *Rozhl Chir* 100, 138–142.
Časopis s recenzním řízením bez impakt faktoru.

Krsková, L., Kalinová, M., Němečková, T., Šípalová, B., Mrhalová, M., Koblížek, M., **Balko, J.**, Háček, J., Nováková-Kodetová, D., Vícha, A., Brož, P., Zápotocký, M., Kabíčková, E., Zámečník, J. (2021). Sekvenování nové generace – nástroj vědy či rutinní patologie? *Cesk Patol* 57, 136–143.
Časopis s recenzním řízením bez impakt faktoru.

Krsková, L., Šípalová, B., Němečková, T., Strnadová, M., Kalendová, T., Kalfusová, A., Alexandra, Malkusová, Šandová, M., Koblížek, M., **Balko, J.**, Vícha, A., Brož, P., Jenčová, P., Štolová, L., Dagmar, Voříšková, Belhajová, M., Zápotocký, M., Sumerauer, D., Zámečník, J. (2022). Efektivní schéma využívané v diagnostice nádorů CNS. *Cesk Patol* 58, 135–137.
Časopis s recenzním řízením bez impakt faktoru.

11 PŘÍLOHY

Příloha I.

Balko, J., Nováčková, M., Škapa, P., Pastor, Z., Chmel, R., Zámečník, J., Chmel, R. (2022). Histopathological examination of the ectocervical biopsy in non-transplanted uteri: A study contributing to the provisional scoring system of subclinical graft rejection after uterus transplantation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 101, 37–45.

IF_{2022} = 4,544 (Q1).

Příloha II.

Balko, J., Havlín, J., CasasMendez, F., Zajacová, A., Koblížek, M., Švorcová, M., Lischke, R., Zámečník, J. (2022). Mapping of the lung megakaryocytes: A role in pathogenesis of idiopathic pulmonary arterial hypertension? *Pathol Res Pract* 237, 154060.

IF_{2022} = 3,309 (Q2).

Příloha III.

Balko, J., Zámečník, J., Chmel, R. (2022). Transplantace dělohy v léčbě ženské neplodnosti z pohledu patologa. *Cesk Patol* 58, 57–60.

Časopis s recenzním řízením bez impakt faktoru.