

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: doktorský

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Mariana Wohlfahrtová**

**Predikce časného rozvoje funkce a rejekce transplantované ledviny**

**Prediction of graft function development and rejection of transplanted  
kidney**

Typ závěrečné práce - disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Praha, 2014

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 4.11. 2014

Mariana Wohlfahrtová

Podpis

**Obor:** Fyziologie a patofyziologie člověka

**Předseda oborové rady:** Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

**Školící pracoviště:** Klinika nefrologie, IKEM, Praha

**Autor:** MUDr. Mariana Wohlfahrtová

**Školitel:** Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Identifikační záznam:

WOHLFAHRTOVÁ, Mariana. *Predikce časného rozvoje funkce a rejekce transplantované ledviny [Prediction of graft function development and rejection of transplanted kidney]*. Praha, 2014. Počet stran 107, počet příloh 3. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika nefrologie IKEM 2014. Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

## Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala za cenné rady, pomoc, bezbřehou podporu, vytvoření pracovních podmínek pro studium a umožnění progresivního vzdělávání svému školiteli profesoru Ondřejovi Viklickému.

Dále bych chtěla poděkovat svým spolupracovníkům, kteří se podíleli na jednotlivých projektech. A to zejména inženýrce Ireně Brabcové z Transplantační laboratoře, která mi byla velmi nápomocná při zvládnutí metodické stránky projektů, analýze a interpretaci molekulárních dat. Ráda bych poděkovala Doc. Filipovi Železnému z Katedry kybernetiky Elektrotechnické fakulty ČVUT za cennou pomoc při biostatistické analýze. Ráda bych poděkovala docentce Evě Honsové za pomoc při interpretaci renálních biopsií a doktorce Aleně Lodererové za spolupráci při imunohistochemickém vyšetření renálních tkáně. Poděkování patří doktorům Petrovi Balážovi a Slavomírovi Rokošnému z Kliniky transplantační chirurgie za spolupráci na projektu „Identifikace ledvin od dárců s rozšířenými kritérii v riziku opožděného rozvoje funkce štěpu“ jako i celému chirurgickému teamu při provádění biopsií v průběhu transplantace.

Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z Kliniky nefrologie TC IKEM za spolupráci, zejména pak primářce Janke Slatinské za trpělivost a podporu při vědecké práci. Chtěla bych poděkovat celému kolektivu Transplantační laboratoře IKEM a to jmenovitě Mgr. Evě Girmanové, Ing. Petře Hrubé, Ing. Petře Hříbové a v neposlední řadě Romaně Poláčkové za spolupráci při vyšetření genové exprese.

Naše práce vznikly za podpory grantů IGA MZ ČR NS10516-3/2009, NT11227-5/2010 a GAČR P301/11/1568. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem pacientům, bez nichž by tato práce nevznikla.

Největší poděkování patří celé mé rodině, zejména však manželovi Petrovi za nezměrnou trpělivost, podporu a povzbuzování.

## Obsah

POUŽITÉ ZKRATKY .....	7
ABSTRAKT .....	10
ABSTRACT .....	11
1. ÚVOD .....	12
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY.....	14
2.1 Opožděný rozvoj funkce štěpu (DGF) .....	14
2.2 Incidence a definice opožděného rozvoje funkce štěpu .....	14
2.3 Rizikové faktory DGF .....	15
2.3.1 Rizikové faktory na straně dárce a při odběru orgánu .....	15
2.3.2 Rizikové faktory na straně příjemce a při transplantaci ledviny .....	16
2.4 Patofyziologie ischemicko/reperfuzního poškození (I/RI) .....	16
2.4.1 Ischemické poškození .....	16
2.4.2 Reperfuzní poškození .....	18
2.4.3 Leukocyty a adhezivní receptory .....	19
2.4.4 Endoteliální dysfunkce a vazospasmus .....	20
2.5 Kvalita dárcovského orgánu .....	21
2.6 Predikce DGF .....	22
2.6.1 Histopatologické skórovací systémy .....	22
2.6.2 Klinické skórovací systémy .....	24
2.6.3 Molekulární profil dárcovské ledviny .....	25
2.6.4 Úskalí “omics“ technologií .....	27
2.6.5 Integrace genomicko-klinicko-histopatologického přístupu .....	28
3. HYPOTÉZA .....	30
4. CÍL PRÁCE .....	31
5. METODIKA .....	32
6. VLASTNÍ VÝSLEDKY VÝZKUMNÉ PRÁCE .....	34
6.1 Molekulární profil ischemicko/reperfuzního poškození a identifikace prediktorů opožděného rozvoje funkce štěpu .....	34

6.2 Identifikace ledvin od dárců s rozšířenými kritérii v riziku opožděného rozvoje funkce štěpu .....	46
6.3 Intrarenální exprese genů po indukční léčbě antithymocytárním globulinem a vliv opožděného rozvoje funkce štěpu .....	56
6.4 Predikce akutní rejekce po transplantaci ledviny vyšetřením exprese tolerantních genů v periferní krvi .....	68
7. DISKUSE .....	79
8. ZÁVĚRY.....	83
9. CONCLUSIONS .....	85
LITERATURA .....	87
PUBLIKACE .....	98
PŘÍLOHY .....	101

## **Použité zkratky**

**ah**, hyalinní ztluštění arteriol (arterial hyalinosis)

**ATG-F**, ATG-Fresenius

**ATN**, akutní tubulní nekróza

**ATS**, ateroskleróza

**BMI**, body mass index

**CAN**, chronická nefropatie štěpu (chronic allograft nephropathy)

**CDKN1A**, inhibitor cyklindependentní kinázy A, (cyclin-dependent kinase inhibitor A)

**CD79B**, cluster of differentiation 79B

**ci**, intersticiální fibróza

**CIT**, doba studené ischémie (cold ischemia time)

**ClCr**, clearance kreatininu

**CMP**, cévní mozková příhoda

**CMV**, cytomegalovirus

**CNI**, kalcineurinový inhibitor

**Cr**, kreatinin

**ct**, tubulární atrofie

**cv**, fibrózní ztluštění intimy

**DCD**, dárce s nebijícím srdcem (donor after cardiac death)

**DD**, zemřelý dárce (deceased donor)

**DGF**, opožděný rozvoj funkce štěpu (delayed graft function)

**DRS**, rizikové skóre dárce (donor risk score)

**DM**, diabetes mellitus

**ECD**, dárce s rozšířenými kritérii (expanded criteria donor)

**eGFR**, odhadnutá glomerulární filtrace (estimated glomerular filtration rate)

**ET**, endotelin

**FoxP3**, forkhead box P3

**GSH**, glutation

**GS**, glomeruloskleróza

**HAVCR1**, buněčný receptor 1 pro virus hepatitidy A (hepatitis A virus cellular receptor 1)

**HD**, hemodialýza

**HLA**, lidský leukocytární antigen

**HT**, hypertenze

**ICAM1**, intercelulární adhezní molekula 1

**IF**, intersticiální fibróza

**IGF**, okamžitý rozvoj funkce štěpu (immediate graft function)

**IGJ**, imunoglobulin J polypeptid

**IGLA**, lehký řetězec imunoglobulinů kappa a lambda (immunoglobulin kappa and lambda light chain)

**IL**, interleukin

**I/RI**, ischemicko/reperfuzní poškození (ischemia/reperfusion injury)

**ITGB2**, beta řetězec integrínu (integrin beta chain)

**KDRI**, index rizika dárcovské ledviny (kidney donor risk index)

**KIM**, molekula renálního poškození (kidney injury molecule)

**LCN2**, lipocalin-2

**MAN1A1**, mannosidas alpha, class 1A, member 1

**mRNA**, messenger RNA

**MS4A1**, membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1

**NGAL**, lipocalin asociovaný s gelatinásou neutrofilů (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)

**NLRP**, nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing

**NF-κB**, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

**NO**, oxid dusnatý

**OR**, poměr šancí (odds ratio)

**PD**, peritoneální dialýza

**POD**, pooperační den

**PRA**, panel reaktivních protilátek (panel reactive antibodies)

**PGI<sub>2</sub>**, prostacyklin



**PGP**, fosfoglykolátfosfatáza

**rATG**, králičí antithymocytární globulin (rabbit antithymocyte globulin)

**ROC AUC**, plocha pod ROC křivkou (receiver operating characteristic area under curve)

**ROS**, reaktivní kyslíkové radikály

**SCD**, dárce se standardními kritérii (standard criteria donor)

**TCL1A**, T-cell leukemia/lymphoma 1A

**TI**, tubulointersticiální

**TLR5**, toll-like receptor 5

**TMEM176B**, transmembrane protein 176B

**TOAG-1**, gen 1 asociovaný s tolerancí (tolerance associated gene 1)

**TORID**, transkript indukovaný a související s tolerancí (tolerance-related and induced transcript)

**Treg**, regulační T lymfocyt

**Tx**, transplantace

**TxA<sub>2</sub>**, tromboxan A<sub>2</sub>

**UF**, ultrafiltrace

**VCAM1**, vaskulární buněčná a adhezní molekula 1 (vascular cell adhesion molecule)

## **Abstrakt**

Zlepšení krátkodobých výsledků transplantace nevedlo ke zlepšení dlouhodobé funkce a přežití štěpů ledvin. Klíčovým problémem zůstává nedostatek orgánů a rostoucí počet marginálních ledvin určených k transplantaci. Kvalita dárcovského orgánu je přitom rozhodující pro riziko opožděného funkce štěpu a omezeného přežití štěpů. Cílem je lépe porozumět ischemicko/reperfuznímu poškození a jeho následkům, předpovědět opožděný rozvoj funkce a rejekce, zlepšit alokaci orgánů k transplantaci a identifikovat pacienty vhodné k minimalizaci či úplnému vysazení imunosupresivní léčby. Analýzou biopsií dárců ledvin jsme zjistili, že nízká kvalita tubulárních buněk a nízká exprese genu pro Netrin-1, tzv. faktor přežití, má vztah k opožděnému rozvoji funkce štěpu. Potvrdili jsme, že reperfuzní fáze ischemicko/reperfuzního poškození vede k minimálním morfologickým, ale významným molekulárním abnormalitám. Tato disociace mezi histologií a molekulární patologií svědčí pro nutnost integrovaného přístupu při hodnocení kvality dárcovského orgánu a jeho správné alokaci k transplantaci. Identifikovali jsme nové kompozitní histologické skóre, tzv. CIV skóre, které spolu s klinickou charakteristikou dárce lépe predikuje riziko opožděného rozvoje funkce po transplantaci ledviny než konvenční metody. Poukázali jsme na významnou heterogenitu dárců s rozšířenými kritérii a identifikovali podskupinu v nízkém riziku opožděného rozvoje funkce. Doporučili jsme rutinně provádět dárcovské biopsie ve všech ledvinách bez ohledu na příslušnost k ECD klasifikaci. Při zkoumání intrarenálního transkriptomu pacientů léčených různou indukční terapií (Thymoglobulin vs. ATG-F) jsme potvrdili sníženou expresi signální dráhy pro NF- $\kappa$ B po indukci s Thymoglobulinem, která by mohla svědčit pro účinnější alloimunitní regulaci a vysvětlovat úspěch této biologické léčby v klinické praxi. V periferní krvi a renální tkáni pacientů bez rejekce jsme prokázali zvýšenou expresi genů asociovaných s funkcí B lymfocytů.

## **Klíčová slova**

ischemicko/reperfuzní poškození, kvalita orgánu, opožděný rozvoj funkce štěpu, transkriptom, transplantace ledviny, predikce

## **Abstract**

Improving the short-term results of kidney transplantation did not result in improving the long-term function and survival of kidney allograft. Organ shortage and increasing number of marginal donors remains the key problem in transplant today. The quality of donor organ is critical for graft function development and survival. The aim is to improve understanding to ischemia/reperfusion injury and its consequences, predict delayed graft function and rejection, improve organ allocation strategy and identify patients suitable for safe drug minimization or complete withdrawal of immunosuppressive therapy.

Analysis of donor kidneys identified poor tubular cell quality and low survival factor, Netrin-1 expression levels, to be associated with delayed graft function. We confirmed that reperfusion phase of ischemia/reperfusion injury leads to minimal morphological but significant molecular abnormalities. Dissociation observed in histology and molecular pathology finding calls for an integrated approach in donor quality organ evaluation and allocation for transplantation. Significant heterogeneity within donors with expanded criteria was shown and subgroup of organs at low risk of delayed graft function was identified. We suggested donor biopsies to be performed as a routine praxis in all kidneys irrespective of ECD classification. Decreased expression of NF-kappaB signalling pathway after Thymoglobulin induction was observed when compared to ATG-F, which could be indicative of more effective alloimmune regulation and explain success of this biological treatment in clinical practice. The up-regulation of several operational tolerance-related genes in the peripheral blood and kidney graft tissues of rejection-free patients in kidney transplant patients was observed.

## **Key words**

delayed graft function, ischemia/reperfusion injury, kidney transplantation, organ quality, prediction, transcriptom

## 1. Úvod

I přes snížení výskytu akutních rejekcí nedošlo u transplantací ledvin v posledních dvaceti letech ke zlepšení výsledků (Jevnikar et al., 2008, Meier-Kriesche et al., 2004). Klíčovým problémem zůstává nedostatek orgánů k transplantaci a rostoucí počet pacientů na čekací listině (Womer et al., 2009). Kvalita dárcovského orgánu určuje krátkodobé i dlouhodobé výsledky transplantace ledvin.

Mnoho autorů se pokoušelo stanovit kvalitu dárcovské ledviny a předpovědět výsledky transplantace na základě klinických parametrů dárce a příjemce, histologického vyšetření a vyšetření transkriptomu v čase odběru ledviny k transplantaci.

Ukázalo se, že predikční skóre založené na klinické charakteristice dárce funguje na velkých počtech pacientů, ale ztrácí sílu při posuzování konkrétního pacienta (Grossberg et al., 2006). Histologické nálezy dárcovských biopsií mohou pomoci při posouzení strukturální integrity dárcovské ledviny, poskytnout informace o preexistujícím poškození dárcovské ledviny a sloužit jako výchozí bod při sledování změn v čase (Randhawa et al., 2001). Ke snížení počtu odmítnutých orgánů k transplantaci jsou ale potřebné další prospektivní studie, které by vylepšily alokaci orgánů a umožnily přesnější predikci výsledků.

Vyšetřením molekulárního profilu lze zjistit změny, které nejsou viditelné při histologickém vyšetření či detekovatelné klinickým vyšetřením (Famulski et al., 2007). Molekulární profil poskytuje kvantitativní měření zánětu a aktivace imunity a odráží změny v dráhách asociovaných s poškozením a reparací (Boros et al., 2006).

Cestou k dosažení co nejlepších výsledků je individualizace přístupu na základě posouzení kvality dárcovského orgánu, příjemce, peri- a potransplantačních událostí. Správná aplikace v klinické praxi vyžaduje identifikaci genových prediktorů a jejich integraci s klinickými a histopatologickými daty (Mueller et al., 2011).

Při rozhodování o přijmutí či odmítnutí orgánu k transplantaci a pro individualizaci potransplantační péče je důležité správně zhodnotit kvalitu orgánu v čase odběru. Toto v současnosti představuje závažný klinický problém. Vzhledem k rostoucímu počtu tzv. marginálních dárců, většímu riziku opožděného rozvoje funkce

štěpu (DGF) a s tím související omezenou dlouhodobou funkcí štěpu lékaři často chybují a z opatrnosti odmítají potenciálně využitelné orgány (Mueller et al., 2011).

## **2. Přehled problematiky**

### **2.1 Opožděný rozvoj funkce štěpu (DGF)**

Opožděný nástup funkce štěpu ledviny je forma akutního renálního selhání, která vede k potransplantační oligurii, zvýšené imunogenicitě štěpu, riziku akutní rejekce a zkrácení přežití štěpu.

Z experimentálních studií je známo, že ischemie a znovuobnovení krevního průtoku (reperfuze) v ischemicky poškozených ledvinách po hypotermické prezervaci aktivuje sled udalostí, které udržují poškození ledvin a hrají stěžejní roli v opožděném rozvoji funkce.

Zlepšení managementu dárce a příjemce, stejně jako diagnostických a léčebných postupů nevedlo ke snížení výskytu DGF ani ke zmírnění krátkodobých a dlouhodobých následků. Částečným vysvětlením tohoto jevu je rozšíření kritérií pro akceptování dárců, zvýšený počet marginálních a starších dárců i akceptování marginálních příjemců, kteří jsou ve vyšším riziku opožděného rozvoje funkce štěpu (Perico et al., 2004).

### **2.2 Incidence a definice opožděného rozvoje funkce štěpu**

Incidence DGF široce kolísá mezi 2-50% v závislosti na transplantačním centru a populaci dárců (kadaverózní vs. žijící dárce, marginální dárce, dárce s nebíjícím srdcem) (Koning et al., 1997, Ojo et al., 1997). Dalším důvodem široké variability incidence DGF je její nejednotná definice. Časně po transplantaci ledviny se renální funkce pohybuje od anurie přes neoligoanurické akutní poškození ledvin (AKI), přes pomalý až po okamžitý rozvoj funkce. Nicméně, termíny DGF a ATN se často chybně používají k definici stejné poruchy, i když první z termínů je označení pro klinickou diagnózu, zatímco druhý výraz je histopatologický nebo-li patogenetický (Perico et al., 2004). Velké multicentrické studie většinou definují DGF jako potřebu dialýzy v prvním týdnu po transplantaci ledviny (Koning et al., 1997). I když je tato definice jednoduchá, vyloučí pacienty s dlouhodobým neoligoanurickým akutním poškozením ledvin, kteří nemají jinou indikaci k dialýze, a také falešně identifikuje pacienty s pomalým nástupem funkce štěpu, kteří mohou vyžadovat dialýzu z jiné indikace než azotemie, jako je např. hyperkalemie.

V některých menších studiích byla DGF definovaná např. jako diuréza nižší než 1200ml/den nebo pokles sérového kreatininu (S-Cr) o méně než 10% v průběhu 48 hodin (Shoskes et al., 2001). Jiné studie definovaly nástup funkce štěpu jako pokles S-Cr pod 221  $\mu\text{mol/L}$  (Cosio et al., 1997) nebo minimální clearance kreatininu 10 ml/min (ClCr vypočtený na základě rovnice Cockrofta a Gaulta) 10. den po transplantaci ledviny (Giral-Classe et al., 1998). Přestože neexistují jasné důkazy, které by upřednostnily některou ze zmíněných definic, je v klinické praxi nejpoužívanější definicí DGF potřeba HD v 1. týdnu po transplantaci ledviny.

## **2.3 Rizikové faktory DGF**

### **2.3.1 Rizikové faktory na straně dárce a při odběru orgánu**

S klesající nabídkou orgánů k transplantaci došlo k nárůstu zájmu o marginální dárce, a to o dárce s nebijícím srdcem (DCD, donors after cardiac death) a tzv. ECD dárce (expanded criteria donors). ECD je dárce starší 60 let nebo starší 50 let s minimálně 2 ze 3 komorbidit: anamnéza hypertenze,  $\text{S-Cr} > 132 \mu\text{mol/L}$ , cerebrovaskulární příčina smrti (Rosengard et al., 2002). Přes podobné jednoroční přežívání mají štěpy ledvin od DCD dárců dvakrát vyšší riziko ATN než štěpy od dárců s bijícím srdcem (Hernandez et al., 1999). Svou roli hraje i nutnost inotropní podpory. U štěpů od dárců bez nutnosti inotropní podpory dochází častěji k okamžitému rozvoji funkce štěpu (83%) a k lepšímu jednoročnímu přežití (91%) než u štěpů od dárců na inotropní podpoře (58% a 73%) (Marshall et al., 1996). V rozvoji DGF hraje roli i způsob prezervace orgánů, zejména při akceptaci marginálních orgánů od ECD a DCD dárců a to ve prospěch pulzatilní perfuze před jednoduchým uskladněním na ledu (Shoskes et al., 1996). Dlouhá doba studené ischémie (CIT) je dalším z rizikových faktorů, zejména u mezinárodních programů sdílení orgánů (např. americký UNOS, evropský Eurotransplant), kdy doba studené ischémie často přesáhne i 24 hodin. Data z amerického registru ukázala až 23% nárůst rizika DGF na každých 6 hodin CIT (Ojo et al., 1997). Věk dárce je dalším významným rizikovým faktorem. Riziko DGF se zdvojnásobuje u štěpů od dárců starších 55 let (Halloran et al., 2001).

### **2.3.2 Rizikové faktory na straně příjemce a při transplantaci ledviny**

Prerenální, renální a renální faktory u příjemce mohou přispět k rozvoji DGF. Nejčastější prerenální příčinou je hypovolémie příjemce (Dawidson et al., 1992). Některé studie se zabývaly vlivem druhu dialyzační léčby na rozvoj funkce štěpu a označily peritoneální dialýzu za méně rizikovou v porovnání s hemodialýzou (Snyder et al., 2002). Souhrn rizikových faktorů pro opožděný rozvoj funkce štěpu ledviny je uveden v tabulce č. 1.

### **2.4 Patofyziologie ischemicko/reperfuzního poškození (I/RI)**

Ischemicko/reperfuzní poškození aktivuje ve štěpu ledviny sled udalostí, které udržují renální poškození a hraje stěžejní roli v opožděném rozvoji funkce. Objasnění patofyziologie I/RI by mohlo přispět ke snížení výskytu opožděného rozvoje funkce štěpu ledviny.

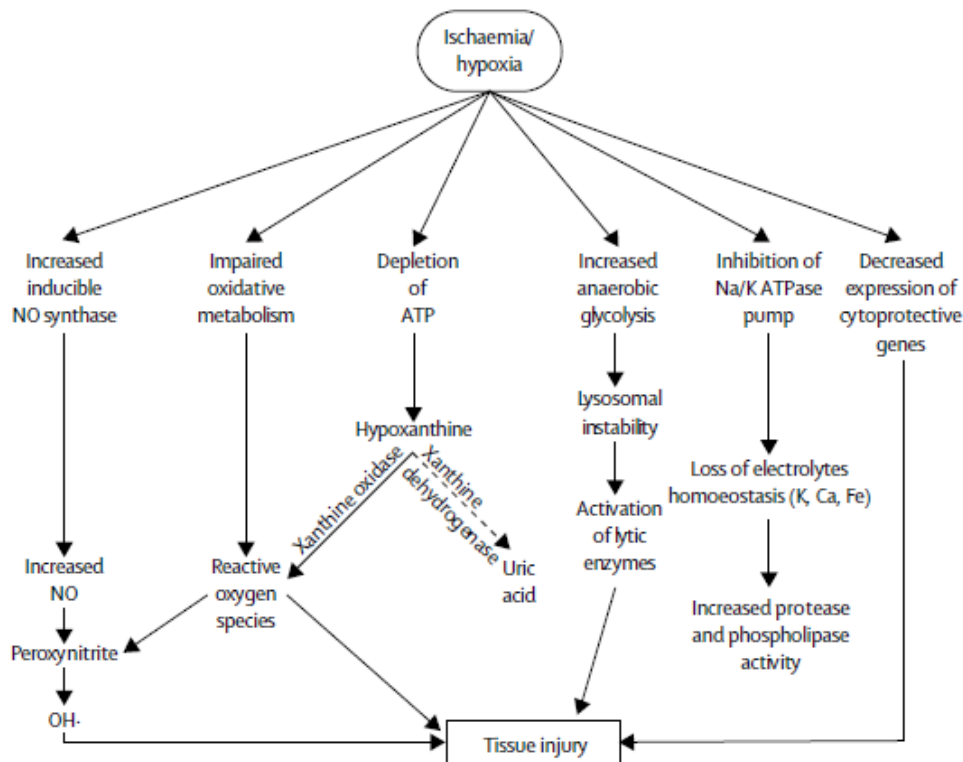
#### **2.4.1 Ischemické poškození**

Při ischemii trpí tkáň nedostatkem kyslíku a živin a dochází k hromadění odpadních produktů metabolismu. K hlavním biochemickým změnám, ke kterým dochází na buněčné úrovni (obr. 1), patří inhibice oxidačního metabolismu, vyčerpání ATP, zvýšení anaerobní glykolýzy a inhibice pumpy pro Na/K ATPázu. ATP se rychle štěpí na hypoxanthin, který v nepřítomnosti kyslíku nemůže být dále metabolizován, jelikož tento proces probíhá pouze za aerobních podmínek (Edelstein et al., 1997). Rychlá anaerobní glykolýza vede k hromadění kyseliny mléčné, která snižuje intracelulární pH a k lyzozomální nestabilitě s aktivací lytických enzymů. Inhibována je rovněž vazba přechodných kovů jako např. železa na jejich proteinové nosiče (transferin, ferritin). To vede ke zvýšení intracelulární koncentrace volného železa, silného katalyzátoru reakcí, které vytvářejí kyslíkové radikály (Haugen et al., 1999). Generování těchto radikálů indukuje produkci jiných radikálů jako je oxid dusnatý (NO), který reaguje se superoxidovými radikály za vzniku peroxynitritu. Tento silný oxidant modifikuje proteiny tvorbou 3-nitrotyrozinu a to vede k poškození membrány (Edelstein et al., 1997). Navíc má NO potenciál narušit aktivní cytoskelet, což vede k odlupování proximálních tubulárních buněk a k tubulární obstrukci. Přesto, že zvýšená tvorba NO



inducibilní NO syntázou může zmírnit poškození ledvin podpořením vazodilatace, většina studií naznačuje, že NO hraje v této situaci negativní roli přes aktivaci poškození indukovaného kyslíkovými radikály (Perico et al., 2004).

V reakci na renální ischémii dochází k aktivaci cytoprotektivních mechanismů včetně rychlého snížení buněčné metabolické aktivity. V ledvinách od kadaverózních dárců je snížená exprese genů kódujících faktory důležitá pro adaptivní odpověď štěpu jako je například hemoxygenáza 1, vaskulární endoteliální růstový faktor a Bcl2 (Lemos et al., 2003). Tato snížená exprese se jeví jako defektní adaptace na ischemicko/reperfuzní poškození a může mít negativní vliv na krátkodobou funkci štěpu.



**Obrázek 1. Mechanismy biochemických a molekulárních změn při ischemicko/reperfuzním poškození v ledvině.** Přerušovaná čára znázorňuje absenci proměny hypoxantinu na kyselinu močovou za anaerobních podmínek. Přebráno z Perico et al, *Lancet*, 2004 (Perico et al., 2004).

#### 2.4.2 Reperfuzní poškození

Opětovným průtokem krve se v ischemicky poškozených ledvinách po hypotermické prezervaci aktivuje sled událostí, které udržují renální poškození a hrají stěžejní roli v opožděném rozvoji funkce štěpu (obr. 2). Mechanizmy, souhrnně označovány jako generalizovaná zánětlivá odpověď, způsobí přímé poškození tkáně iniciací kaskády škodlivých buněčných odpovědí. Reperfuzí dojde ke znovuzahřátí, reoxygenaci, návratu do aerobního metabolismu (včetně oxidativní fosforylace) a tvorbě ATP. V ischemické tkáni po reperfuzi ale nadále dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku ve vysoké koncentraci. Superoxidový aniont ( $O_2^-$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) spolu reagují za vzniku vysoce reaktivního a cytotoxického hydroxylového radikálu, který iniciuje peroxidaci lipidů buněčné membrány (Haugen et al., 1999).

Za normálních podmínek se v ledvině přirozeně vyskytují antioxidantní enzymy proti účinkům volných kyslíkových radikálů (Edelstein et al., 1997, Haugen et al., 1999). Nicméně v čase reperfuze ischemické tkáně je obranná schopnost těchto lapačů přemožena rychlou tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů, což má za následek smrt buňky apoptózou (Castaneda et al., 2003). Odpověď hostitele může dokonce potencovat poškození volnými kyslíkovými radikály.

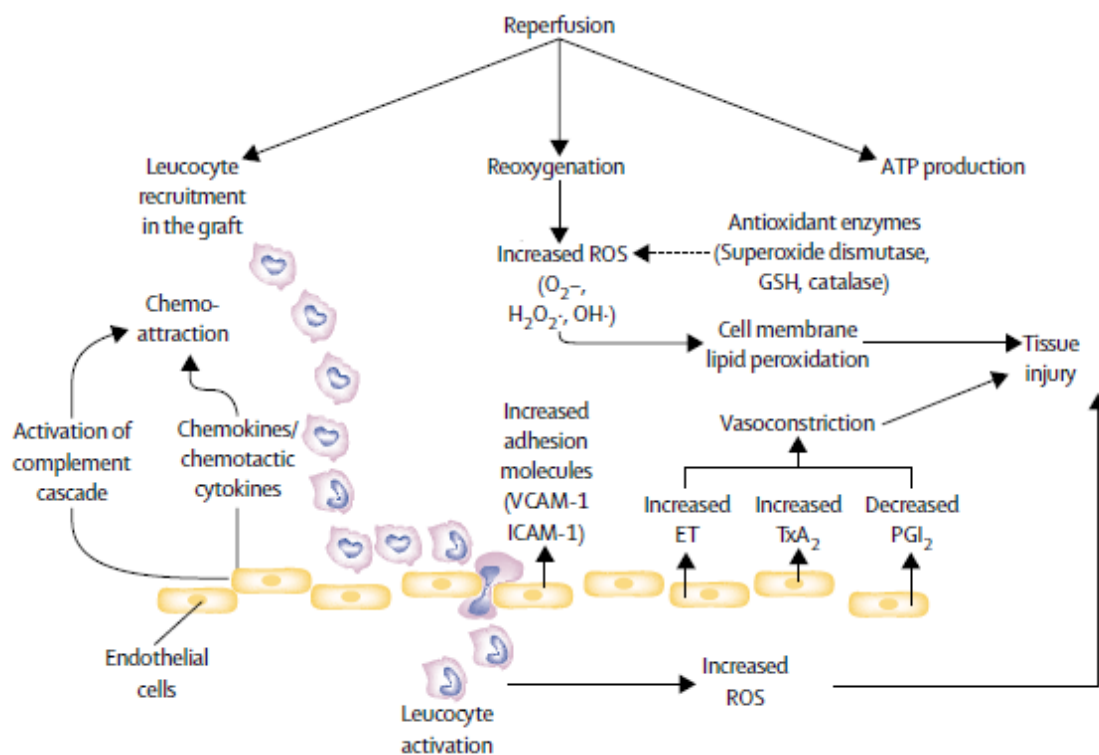
Zánětlivé cytokiny a chemokiny uvolněné při expresi adhezivních molekul na povrchu buněk přitahují neutrofile a monocyty, což vede k uvolnění dalších reaktivních kyslíkových radikálů a zhoršení renálního poškození (Haugen et al., 1999). Chemokiny, exprimované krátce po ischemii a reperfuzi, jsou silnými chemoatraktanty neutrofilů. To vysvětluje zjištění, že neutrofile jsou primárním mediátorem poškození (DeVries et al., 2003). Okamžitá indukce ELR-CXC chemokinové podrodiny je patrná již 1 hodinu po transplantaci a vede k infiltraci neutrofilů (Chandrasekar et al., 2001). Druhý krok v expresi chemokinů, jehož součástí je interferon-gamma indukovatelný protein 10, monokin indukovaný interferonem-gamma a chemoatraktantový protein monocytů 1, začíná 3 hodiny po transplantaci a slouží k další infiltraci neutrofilů a iniciaci infiltrace monocytů, NK buňkami a T lymfocyty (DeVries et al., 2003). Vzhledem k tomu, že zvýšená exprese chemokinů závisí přinejmenším částečně na prvním kroku, mohlo by terapeutické zacílení proti chemokinům okamžitě po transplantaci, vést k ovlivnění všech fází transplantačního poškození. Další chemoatraktanty, zejména C5a

z komplementové kaskády, také přispívají k infiltraci neutrofilů při ischemicko/reperfuznímu poškození tkáně, přičemž zdrojem komplementových komponentů je ledvina sama o sobě (Arumugam et al., 2002).

### **2.4.3 Leukocyty a adhezivní receptory**

Umístění leukocytů v místech poškození nebo zánětu je z velké části zprostředkováno adhezivními receptory (obr. 2). Po počátečním pohybu leukocytů na aktivovaném endotelu interagují jejich receptory s adhezivními receptory na endoteliálních buňkách. To vede k jejich imobilizaci na endotelu a diapedéze stěnou cévy. Tyto procesy jsou zprostředkovány molekulami podobnými imunoglobulinům: intercelulární adhezivní molekulou 1 (ICAM1) a vaskulární buněčnou adhezivní molekulou 1 (VCAM1) a jejich ligandy na leukocytech (integrin-1 a integrin-2) (Perico et al., 2004).

Během reperfuze adherentní leukocyty obliterují lumen kapilár, vytvářejí proteolytické enzymy a uvolňují další cytokiny. Dochází ke kongesci ve vasa recta, poškození perfuze peritubulárními kapilárami a ke zvýšení endoteliální permeability (Bonventre et al., 1996). Zvýšená adheze vede dále ke vzniku volných kyslíkových radikálů a infiltraci tkáně aktivovanými leukocyty. Konečným výsledkem složité souhry mezi reaktivními kyslíkovými radikály, chemokiny a cytokiny, faktory komplementu, adhezivními receptory a leukocyty je zánětlivý proces, který poškodí epitelové buňky ledvin, zejména proximálního tubulu.



**Obrázek 2. Schématické znázornění migrace leukocytů, aktivace endoteliálních buněk a tvorby zánětlivých a vazoaktivních mediátorů, které spouštějí poškození tkáně po reperfuzi štěpu.** Pozn.: ROS, reaktivní kyslíkové radikály; GSH, glutation; TxA<sub>2</sub>, tromboxan A<sub>2</sub>; ET, endotelin; PGI<sub>2</sub>, prostacyklin. Přerušovaná čára znázorňuje inhibici. Přebráno z Perico et al, *Lancet*, 2004. (Perico et al., 2004)

#### 2.4.4 Endoteliální dysfunkce a vazospasmus

Ischemická ledvina po reperfuzi vykazuje různé stupně buněčného a funkčního poškození. To vede ke zvýšené renovaskulární rezistenci, zvýšené rezistenci aferentních arteriol a k významnému snížení rychlosti glomerulární filtrace, která je převážně důsledkem snížení glomerulárního transkapilárního hydraulického tlakového gradientu (obr. 2). Pomocí termodifuzních sond vložených do ledvinné kůry 30 pacientů po transplantaci ledvin byla zaznamenána nižší renální mikroperfúze u pacientů s opožděným nástupem funkce štěpu v porovnání se štěpy s okamžitým rozvojem funkce (Angelescu et al., 2003). Na vzniku vaskulární rezistence se podílí těžké poškození proximálních tubulů, které vede ke zpětnému transtubulárnímu prosaku filtrátu a

zhoršení proximální reabsorpce sodíku. K této vazomotorické nefropatii přispívá zpětný tlak z tubulů obturovaných buněčnou debris. Poškozený cévní endotel narušuje rovnováhu metabolismu eikosanoidů, což způsobuje vazokonstrikci z nadbytku tromboxanu a nedostatku prostacyklinu. V peritubulární kapilární síti ledvin vystavených ischemii dojde ke zvýšení exprese mRNA a proteinu pro endotelin, který zprostředkovává vasomotorické ischemicko/reperfuzní poškození. Ukázalo se, že pacienti s opožděným nástupem funkce štěpu mají vysokou koncentraci endotelinu-1 v séru (Schilling et al., 1996). Úloha endotelinu ve zprostředkování cévních spasmů, které mohou udržovat potransplantační poškození ledvin je podporována experimentálním zjištěním, že selektivní a neselektivní antagoniste endotelinového receptoru zmírní ischemicko/reperfuzní poškození a časnou renální dysfunkci v experimentálním modelu. V tomto prostředí vazokonstrikce pomáhá NO udržovat relaxaci cév a okysličení dřeně a je důležitým faktorem pro překonání poischemické vazokonstrikce (Huang et al., 2002).

## **2.5 Kvalita dárcovského orgánu**

Dlouhodobý výsledek transplantace ledviny závisí od stupně kumulativního poškození. Ten je výsledkem imunitních a neimunitních mechanismů jakými jsou smrt mozku dárce, věk dárce, ischemicko/reperfuzní poškození, ztráta nefronů, infekce nebo alloimunitní odpověď. To vše vede k zánětu a k následné intersticiální fibróze a tubulární atrofii (Famulski et al., 2007, Halloran et al., 1997, Jevnikar et al., 2008). K predikci dlouhodobé funkce je důležité stanovit kvalitu dárcovského orgánu, tj. počet přežívajících nefronů, schopnost orgánu čelit poškození a regenerovat (Bunnag et al., 2009, Famulski et al., 2007, Nijboer et al., 2004). Vztah kvality orgánů k výsledku transplantace je doložen řadou důkazů:

- štěpy od žijících dárců mají lepší 5- leté (80%) i 10- leté (55%) přežití v porovnání se štěpy od kadaverózních dárců (68%, 45%) (Cecka2005).
- kvalita kadaverózního orgánu určuje 35-45% variability časně funkce štěpu (Suri et al., 1999).
- opožděný rozvoj funkce štěpu jako následek peritransplantačního poškození je

ve srovnání s okamžitým rozvojem funkce spojen s horší dlouhodobou funkcí štěpu (Cosio et al., 1997, Suri et al., 1999)

- transplantace ledvin od žijících dárců bez HLA shody dosahují lepších výsledků než transplantace ledvin od kadaverózních dárců s HLA shodou (Terasaki et al., 1995).
- věk dárce je nejsilnějším prediktorem dlouhodobých výsledků transplantací (Koppelstaetter et al., 2008)

Při rozhodování o akceptování orgánu k transplantaci je důležité správně zhodnotit kvalitu orgánu v čase odběru. Počet tzv. marginálních dárců narůstá a lékaři často z opatrnosti odmítají potencionálně využitelné orgány (Sung et al., 2008, Womer et al., 2009). V roce 2005 byla v USA odmítnuta každá 7. ledvina převažně z důvodu horší kvality určené z histologického vyšetření i přesto, že je známo, že histologie jen omezeně koreluje s výsledkem transplantace a morfologický obraz disociuje s funkcí ledviny ([www.ustransplant.org](http://www.ustransplant.org)) (Mengel et al., 2008, Nickleit 2009). Přesnější hodnocení kvality orgánu v kombinaci s klinickou charakteristikou dárce a příjemce by mohlo pomoci zvýšit množství využitých orgánů, umožnit lepší alokaci a individualizaci péče o dárce a příjemce (Halloran et al., 2001, Ojo et al., 1997).

## **2.6 Predikce DGF**

### **2.6.1 Histopatologické skórovací systémy**

K přesnému posouzení kvality orgánu a predikci výsledku transplantace nepostačují informace o dárce a příjemci. Predikci by mohly zlepšit histopatologické nálezy v předimplantační nebo poreperfuzní biopsii. Biopsie definuje strukturální integritu ledviny (Randhawa et al., 2001), poskytuje základní anatomické informace, znalost preexistujícího onemocnění dárce, umožňuje sledování změn v čase. Tzv. biopsie v čase 0 (tedy před transplantací) je nezbytná pro práci s marginálními dárce a v mnohých centrech patří mezi standardy péče. Tabulka č. 2 shrnuje dostupná data ze studií zabývajících se predikcí opožděného rozvoje funkce štěpu založené na histopatologickém skóre.

Na spojitost glomerulosklerózy (GS) s výsledkem transplantace jako první poukázal Gaber, když zjistil vyšší výskyt DGF, vyšší sérový kreatinin v 1. roce a vyšší ztrátu štěpu u ledvin s výskytem více než 20% glomerulosklerózy v dárcovské biopsii. Toto pozorování vedlo k širokému uplatňování empirického pravidla, že ledviny s touto mírou glomerulosklerózy by neměly být k transplantaci použity (Gaber et al., 1995, Randhawa et al., 2001). Mnoho jiných studií tyto nálezy podpořilo (Anglicheau et al., 2008, Chapman et al., 2005, Nankivell et al., 2001), zatímco jiné je vyvrátily (Bosmans et al., 2000, Edwards et al., 2004, Munivenkatappa et al., 2008). S krátkodobými i dlouhodobými výsledky transplantací byly spojovány i cévní změny, zejména fibrointimální ztlustění a arterioskleróza, stejně jako změny tubulointersticia, zejména tubulární atrofie a intersticiální fibróza (Bosmans et al., 2000, Cosio et al., 2005, Chapman 2005, Nankivell et al., 2001, Nankivell et al., 2004). Nankivell ozřejmil, že štěpy s podobnými histologickými nálezy se mohou lišit v jejich osudu po transplantaci (Nankivell et al., 2001, Nankivell et al., 2004). S cílem zvýšit použití a prediktivní hodnotu biopsií v čase 0 rostl zájem o vytvoření tzv. kompozitního prognostického skóre (Nickeleit 2009). Anglicheau ukázal, že kompozitní klinicko-patologické skóre založené na kreatininu dárce, anamnéze hypertenze a procentu glomerulosklerózy v biopsiích v čase 0, je dobrým prediktorem osudu štěpu a výrazně zvyšuje hodnotu biopsie při rozhodování o akceptování orgánu k transplantaci v porovnání se skórovacími systémy, které používají jen klinickou charakteristiku (Anglicheau et al., 2008, Nyberg et al., 2001).

Ačkoliv se kompozitní skórovací systémy, které kombinují klinicko-patologické nálezy, jeví jako slibné, nebyly zatím implementovány do každodenní klinické praxe. Je potřebná další validace na nezávislých kohortách pacientů, zavést jednotný systematický přístup k implantačním biopsiím, sjednotit čas provádění biopsie (před implantací štěpu nebo po reperfuzi), techniku biopsie (klínovitá excise vs. punkční biopsie), techniku skladování (zmražením nebo formalínem) a domluvit se na standardizovaném vyhodnocování v rámci Banffské klasifikace (El-Husseini et al., 2007, Nickeleit 2009). Struktury, které jsou klíčové při progresi renálního poškození, jako např. denzita peritubulární vaskulatury, integrita vasa recta, nebo stupeň zánětu nejsou zatím rutinně v histologických nálezech popisovány (Eardley et al., 2008).

### 2.6.2 Klinické skórovací systémy

Četné observační studie hodnotily využitelnost klinických parametrů pro posuzování kvality orgánu určených k transplantaci ledvin, jako i pro predikci krátkodobých a dlouhodobých výsledků či DGF (tabulka č. 3). Přesnou predikcí DGF bychom mohli lépe vybrat správného příjemce, lépe definovat péči o dárce i příjemce, zmírnit následky poškození orgánu a tak zlepšit dlouhodobé výsledky transplantací. Problémem klinických studií zabývajících se DGF je již výše uvedená nejednotná definice DGF a absence spolehlivých biologických ukazatelů, což přispívá k nedostatku terapeutických možností a k pozdní terapeutické intervenci.

Irish vyvinul nomogram, pomocí kterého byl na základě 16 nezávislých rizikových faktorů dárce a příjemce schopen vypočítat pravděpodobnost DGF pro jednotlivého pacienta (Irish et al., 2003, Irish et al., 2010). Prospektivní validace nomogramu neprokázala výhody využití tohoto nástroje při rozhodování o alokaci orgánu či individualizaci imunosuprese k minimalizaci DGF (Grossberg et al., 2006). Nyberg a Schold vyvinuli skóre, kterým identifikovali vztah mezi klinickými parametry dárce (věk a sérový kreatinin) kvalitou orgánu a krátkodobými i dlouhodobými výsledky transplantace. Nybergovo DD (Deceased Donor) skóre zahrnuje informace o dárci (věk, anamnéza hypertenze, clearance kreatininu odhadnutou pomocí rovnice Cockcroft-Gault, příčinu smrti a shodu v HLA) (Nyberg et al., 2003). Scholdovo DRS skóre kombinuje věk dárce, CMV status, etnicitu, délku studené ischemie, shodu v HLA, příčinu úmrtí dárce, anamnézu hypertenze a diabetes mellitus (Schold et al., 2005). Raovo KDRI skóre (Kidney Donor Risk Index) zahrnuje 15 faktorů dárce a příjemce, které by v čase transplantace mohli pomoci při rozhodování o akceptování orgánu (Rao et al., 2009). Plata-Munoz potvrdil, že Nybergovo DD skóre je u marginálních ledvin schopné predikovat výskyt DGF a výši sérového kreatininu do 1. roku po transplantaci ledviny (Plata-Munoz et al., 2010). Snanoudj ukázal, že na základě samotné odhadnuté glomerulární filtrace dárce (eGFR) je možné rozhodnout o alokaci ledvin od tzv. ECD dárců k duální nebo jedné transplantaci ledviny (Snanoudj et al., 2009).

Navzdory všem observačním studiím není žádný ze skórovacích systémů rutinně používán v klinické praxi. Ačkoliv se tyto predikční skórovací systémy uplatňují na velkých souborech, nenašly místo v klinické praxi. Zahrnutí komplementárních



informací o histologii a genové expresi dárcovské ledviny by mohlo pomoci individualizovat a zlepšit výsledky predikce DGF.

### **2.6.3 Molekulární profil dárcovské ledviny**

Protetomika, transkriptomika a metabolomika patří mezi tzv. „omics“ technologie, které by mohly pomoci lépe porozumět patofyziologickým mechanismům, najít cílové dráhy a geny pro rozvoj nových léčiv a zlepšit výsledky transplantační medicíny. Banffské pracovní skupiny se již jistou dobu snaží zkombinovat histopatologii s molekulárními parametry. Vyšetření změn transkriptomu v dárcovském orgánu je atraktivní způsob jak spolu s klinickým a histopatologickým vyšetřením určit jeho kvalitu. Molekulární profilování přesahuje hranice histopatologie. Je známo, že akutní poškození ledvin, ke kterému dochází v průběhu každé transplantace, je charakterizované disociací mezi patologií a fyziologií (Rosen et al., 2008). Kromě toho je měření genové exprese objektivní, kvantitativní a vhodné k precizní analýze.

První transkriptomové studie využívaly buď PCR k měření malého počtu vybraných genů (Avihingsanon et al., 2005), nebo měřily celogenomové profily genové exprese (Hauser et al., 2004, Kurian et al., 2005).

Microarray analýzy ukázaly, že na rozdíl od morfologického vyšetření je zánětlivý transkriptom schopen odlišit ledviny od žijících a kadaverózních dárců (Hauser et al., 2004). Hauser a Naesens poukázali na vztah mezi komplementem a nárůstem inflamace ve štěpech od kadaverózních dárců (Hauser et al., 2004, Naesens et al., 2009). Kromě aktivace komplementové kaskády byl u kadaverózních ledvin popsán signifikantní nárůst transkriptů asociovaných s odpovědí akutní fáze a signifikantní pokles v transkriptech genů asociovaných s metabolismem. Kurian poukázal na vysokou sensitivitu při detekci jemných klinických a histologických zánětlivých změn, když byl schopen u pacientů rok po dárcovské nefrektomii ve zbylé ledvině s normálním histologickým nálezem detekovat zánětlivou odpověď při vyšetření transkriptomu (Kurian et al., 2005). Další analýzy identifikovaly v předimplantační biopsii soubor genů spojených s DGF (Mas et al., 2008) a prokázaly lepší prediktivní hodnotu v porovnání s klinickými a histologickými skórovacími systémy (Mueller et al., 2008).

Možnost zachytit jemné zánětlivé změny, ischemicko/reperfuzní poškození a imunitní aktivaci transkriptů je také podpořena studii založenými na vyšetření biopsie v čase 0 metodou PCR. Hoffman analyzoval dynamiku ischemicko/reperfuzního poškození (Hoffmann et al., 2002). Stav okamžitě po reperfuzi byl charakterizován zvýšenou hladinou transkriptů celulární adheze, chemotaxe, apoptózy a aktivace monocytů, transkriptů T lymfocytů a kostimulace. Avihingsanon použil PCR měření 15 předem vybraných genů v reperfuzních biopsiích a zjistil, že adheze indukovaná zánětem, aktivace imunity a apoptóza byly spojeny s DGF, akutní rejekcí a horší funkcí štěpu v 6. měsíci po transplantaci (Avihingsanon et al., 2005). Celkově tyto nálezy poukazují na to, že změny v expresi genů jsou citlivější než morfologické poškození.

Přesto je obtížné identifikovat genové dráhy a transkripty, které by predikovaly dlouhodobou funkci štěpu. Perco popsal 80 genů exprimovaných u ledvin s histologickým poškozením (Perco et al., 2009). Tyto geny byly zapojeny do imunity a obrany, buněčné struktury a adheze, buněčného cyklu a komunikace. Zajímavé je, že zatímco klinické a histologické ukazatele byly schopny vysvětlit pouze 14% variability sérového kreatininu v 1. roce, kombinace pouhých tří genů (NLRP2, IGJ, IGLA) vysvětlila 28% variability. K podobným závěrům dospěly i jiné studie založené na PCR. Bodonyi-Kovacs ukázal, že klinické ukazatele v kombinaci s intrarenální expresí lépe predikují výsledek transplantace (Bodonyi-Kovacs et al., 2010). Cravedi potvrdil, že ledviny od starších dárců s vyšší expresí ITGB2 měly horší jednorocní funkci, proteinurii a vyšší výskyt transplantační glomerulopatie (Cravedi et al., 2010). Všechny tyto nálezy podporují představy o vlivu ischemicko/reperfuzního poškození na funkci štěpu v 1. roce.

V současné době se zkoumá mnoho potencionálních biologických ukazatelů. Velký potenciál se připisuje ukazatelům akutního poškození ledvin: KIM-1 (HAVCR1), NGAL (LCN2), IL18, nebo ukazatelům stárnutí: PGP, CDKN1A (p21), CDKN2A. Lze předpokládat, že spíše než jednotlivé biologické ukazatele, budou v identifikaci subjektů ohrožených ischemicko/reperfuzním poškozením, opožděným rozvojem funkce štěpu či nižší dlouhodobou funkcí přínosnější skupiny ukazatelů.

Vyšetřením molekulárního profilu jsme schopni detekovat změny, které nejsou zachytitelné morfologickým či klinickým vyšetřením. Vyšetření zároveň poskytuje

kvantitativní měření zánětu a detekuje aktivaci biologických tříd a cest jako např. zvýšenou hladinu transkriptů imunitní odpovědi, obrany, oxidačního stresu a paralelní snížení transkripce genů asociovaných s metabolismem, transportem a vázáním iontů, čímž zachází za hranice histopatologického a klinického vyšetření. Často má normální histologický obraz vysoce abnormální molekulární profil (Mas et al., 2010, Mueller et al., 2007).

Při vyšetření transkriptomu není cílem deskriptivně popsat molekulární profil, ale rozluštit odpověď genetického profilu. Například zánětlivá odpověď asociovaná s ischemicko/reperfuzním poškozením nebo opožděným rozvojem funkce štěpu sama o sobě nepredikuje výsledek, ale naznačuje, že zánětlivá odpověď může odrážet poškození tkáně a zároveň být nevyhnutelná pro reparaci tkáně. Mnoho studií na nezávislých kohortách ukázalo, že při ischemicko/reperfuzním poškození a opožděném rozvoji funkce štěpu dochází k aktivaci stejných genových drah, které jsou spojeny s omezenou dlouhodobou funkcí a rejekcí, přičemž rozdíl je jen kvantitativní.

#### **2.6.4 Úskalí “omics“ technologií**

Rozdíl mezi microarray a PCR přístupem spočívá v obecně nižší sensitivitě microarray technologie. K analýze dat genových expresí je potřebná jistá dávka statistické přísnosti. Často se identifikují rozdílně exprimované geny, které jsou pak validovány klastrovou analýzou na stejné kohortě pacientů a dosahují falešně nadhodnocených výsledků. Toto jen podtrhuje potřebu nezávislé validace. Dále je potřebné zvolit dostatečně vysokou hranici v rozdílech genové exprese, kterou budeme považovat za významnou. Opak vede k falešně pozitivním výsledkům. Je potřebné používat korekci na opakované měření. Na druhé straně toto příliš přísné nastavení může vést ke ztrátě biologicky významných rozdílů a k vyřazení vhodných ukazatelů (Allanach et al., 2008). Přístupy založené na PCR, které testují hypotézu s malým počtem genů, mají sice statistickou výhodu v tom, že se nemusí korigovat na tak vysoké množství opakovaných měření, ale nesou s sebou tíhu tzv. bias při selekci genů (Archer et al., 2009, Bustin et al., 2002). Identifikaci silných genových prediktorů ztěžuje nejednotná definice a standardy péče u různých potransplantačních událostí. 100% přesnost jakéhokoliv prediktora je vždy podezřelá (Schold et al., 2010).

Pomocí microarray či PCR je často analyzován bioptický materiál z tkáňové směsi a může obsahovat různé zavádějící struktury jako např. infiltruující buňky. 80% kortikální tkáň ledvin představuje tubulointersticiální kompartment. Tím pádem jsou v transkripčním profilu celého genomu nedostatečně zastoupeny cévní a glomerulární struktury. Podobně se v transkriptomu pravděpodobně neprojeví věk ledviny jako i její funkce a rezervní kapacita, tj. počet nefronů, nesoulad mezi velikostí dárce a příjemce, stupeň glomerulosklerózy, onemocnění dárce (diabetes nebo hypertenze). K optimální interpretaci dat je vhodné doplnit klinické a histopatologické vyšetření.

### **2.6.5 Integrace genomicko-klinicko-histopatologického přístupu**

Události po transplantaci jsou obtížně předvídatelné. Je proto otázné, zdali bude vůbec někdy možné predikovat dlouhodobé výsledky transplantací. K přesnější predikci je potřebný integrovaný přístup a validace na velkém počtu pacientů. Zatím neexistuje molekulární profil nebo individuální biologický ukazatel pro predikci osudu štěpu po transplantaci. Histomorfologické (např. stupeň glomerulosklerózy, periglomerulární fibróza, arterioskleróza, arteriolární hyalinóza), jako i klinické informace o dárce (věk, onemocnění, glomerulární filtrace), se navíc nemusí při vyšetření transkriptomu projevit (Mengel et al., 2008, Nickleit et al., 2009).

Proto je k vývoji individualizovaného skóre pro krátkodobou a dlouhodobou predikci výsledků transplantace potřebný systémový biologický přístup. Integrace molekulárních, klinických a anatomických dat by mohly být tím správným přístupem (Bromberg et al., 2010).

Téměř všechny skórovací systémy zahrnují věk a kreatinin dárce. Nicméně, samotný věk dárce v kombinaci s histopatologickým nálezem nestačí při určování výsledku transplantace a rozhodování o akceptaci orgánu (Foss et al., 2009). Ke komplexnějšímu chápání situace a přesnějšímu odhadu kvality a osudu orgánu může přispět vyšetření molekulárního profilu. Je potřebné lépe porozumět peritransplantačnímu ischemicko/reperfuznímu poškození, reparačním schopnostem, perzistenci zánětlivé odpovědi, uremické paměti a dlouhodobým následkům akutního poškození ledvin. Toto by mohlo pomoci vyvinout cílenou terapii i sekundární prevenci akutního poškození ledvin nejen v transplantační, ale i obecné nefrologii (Peeters et

al., 2008). Morbidita a mortalita akutního poškození ledvin v posledních desetiletích přetrvává i přes pokroky medicíny. Výzkum v transplantologii, v lidském „modelu“ ischemicko/reperfuzního poškození by mohl mít proto mnohem širší význam.

### 3. Hypotéza

Ke zlepšení dlouhodobých výsledků transplantací ledvin je potřebné identifikovat pacienty v riziku opožděného rozvoje funkce štěpu a rejekce, kteří by profitovali z individualizace imunosupresivního režimu a peritransplantační péče. Je známo, že ischemicko/reperfuzní poškození hraje významnou roli v opožděném rozvoji funkce a ovlivňuje dlouhodobé přežití. Domnívame se, že vyšetření transkripčního profilu dokáže citlivě detekovat změny, které nejsou rozpoznatelné při histologickém vyšetření a pomůže poznat mechanismy poškození a možnosti jeho prevence. Předpokládáme, že integrovaným genomicko-klinicko-histopatologickým přístupem dokážeme lépe zhodnotit kvalitu orgánu, předpovědět rozvoj funkce a osud štěpu v době transplantace.

#### 4. Cíl práce

1. Pomocí molekulárně biologických metod - analýzy expresního profilu vybraných genů ve 3 následných biopsiích v průběhu jednotlivých fází ischemicko/reperfuzního poškození (dárcovská, předimplantační, poimplantační biopsie) prokázat, že ischemicko/reperfuzní poškození štěpu ledviny se projeví změnou vybraného expresního profilu.
2. Analýzou expresního profilu vzorku ledviny získané v době odběru orgánu k transplantaci identifikovat genové prediktory opožděného rozvoje funkce štěpu.
3. Integrovaným přístupem, použitím histologického vyšetření ledviny od dárců s rozšířenými kritérii a klinické charakteristiky dárce a příjemce predikovat riziko opožděného rozvoje funkce štěpu.
4. Analyzovat transkriptom transplantované ledviny po indukční léčbě rozdílnými antithymocytárními globuliny a zhodnotit vliv opožděného rozvoje funkce štěpu na molekulární profil.
5. Vyšetřením exprese genů asociovaných s operační tolerancí v periferní krvi predikovat rozvoj akutní rejeckce po transplantaci ledviny.

## **5. Metodika**

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

### **Populace**

K analýzám jsme použili renální tkáň a periferní krev pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny v transplantačním centru IKEM v jednotlivých časových obdobích.

### **Biopsie štěpu ledviny**

Protokolární biopsie byla provedena ve 3. měsíci po transplantaci ledviny, indikační biopsie štěpu při vzestupu Cr o víc než 10%, progresi proteinurie či přetrvávající afunkci štěpu. Dárčovskou biopsii jsme provedli při odběru ledviny k transplantaci. Při samotné transplantaci byla provedena předimplantační (před reperfuzí, na konci ischemie) a poimplantační biopsie (20 min po uvolnění cévních svorek, v období reperfuze). Histologické vyšetření bylo provedeno v souladu s Banffskou klasifikací 2005. Malá část (2mm) z kortikální oblasti bioptického vzorku byla okamžitě uskladněna ve stabilizačním roztoku (RNA later) a skladována při teplotě -80°C do extrakce RNA.

### **RNA extrakce a komplementární syntéza DNA**

Po homogenizaci renální tkáně jsme izolaci RNA provedli s použitím RNA blue agent. Izolovanou RNA jsme zředili v 30  $\mu$ L vody očištěné od RNázy. Čistotu a koncentraci jsme ověřili spektrofotometrem (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). K další analýze jsme použili jen vysoce kvalitní RNA s číslem RNA integrity 8-10. 2  $\mu$ g RNA jsme použili k přepisu do komplementární DNA s použitím Superscript reversní transkriptázy (Nitrogen, CA). RNA byla ošetřena DNázou. Jen komplementární vzorky DNA bez kontaminace genomickou DNA byly použity k analýze metodou real-time RT-PCR pomocí TaqMan low-density array (TLDA).

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

Vyšetření genového expresního profilu bylo provedeno použitím kvantitativní eseje real-time RT-PCR založené na technologii Taqman low-density array (TLDA). TLDA je mikrofluidní karta přizpůsobená potřebám konkrétního projektu, která obsahuje sondy



pro kandidátní geny vybrané z katalogu firmy Applied Biosystems. Data jsme kvantifikovali pomocí SDS 2.4 softvéru (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### **Analýza dat pro genovou expresi**

Hodnoty relativní genové exprese jsme získali z TLDA analýzy použitím  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metody pro relativní kvantifikaci (RQ, z angl. relative quantity), která je implementována v Applied Biosystems RQ Manager Software v1.2.1 (Applied Biosystems). K výpočtu relativní kvantity jsme porovnali genovou expresi zkoumaného vzorku s kontrolním vzorkem. Data jsou prezentována jako násobek genové exprese zkoumaného vzorku vztažené k endogennímu referenčnímu genu a poměřená k relativní kvantitě kontrolního vzorku vztažené k endogennímu referenčnímu genu.

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

## 6. Vlastní výsledky výzkumné práce

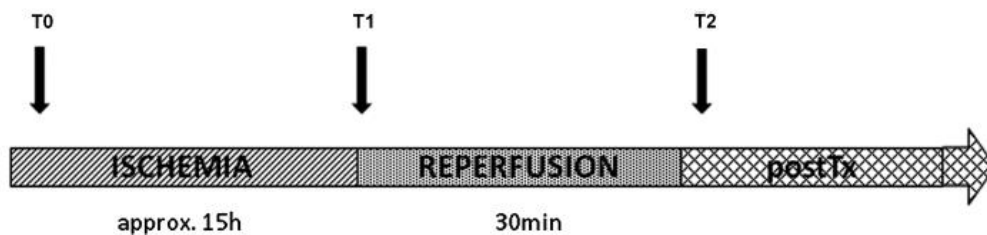
### 6.1 Molekulární profil ischemicko/reperfuzního poškození a identifikace prediktorů opožděného rozvoje funkce štěpu

#### Úvod

Ischemicko/reperfuzní poškození vede často k opožděnému rozvoji funkce a negativně ovlivňuje přežití transplantované ledviny. Tato prospektivní studie měla za cíl popsat intrarenální transkriptom v průběhu ischemicko/reperfuzního poškození a identifikovat geny asociované s opožděným rozvojem funkce štěpu.

#### Metodika

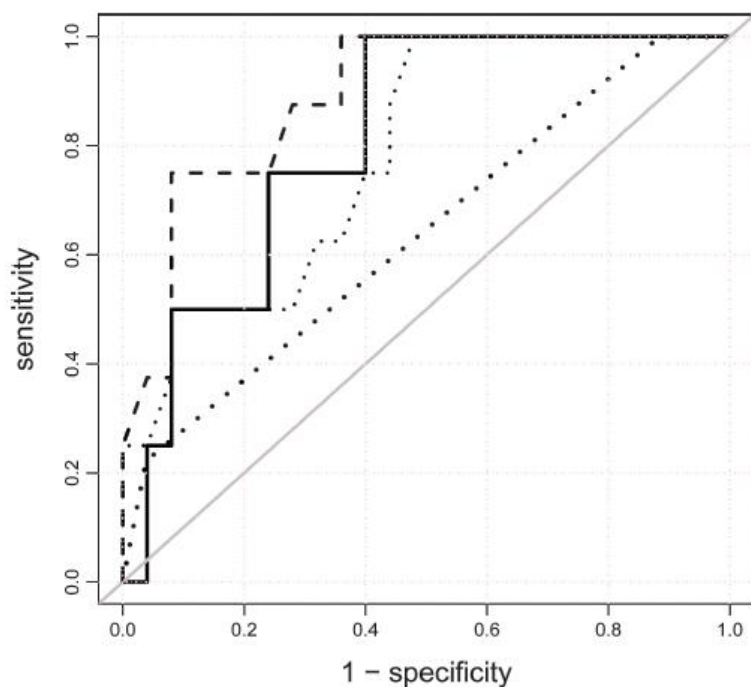
Intrarenální transkripční profil ischemicko/reperfuzního poškození jsme vyšetřovali ve třech sekvenčních biopsiích štěpu ledviny, a to při odběru ledviny (dárcovská biopsie) a v průběhu transplantace (předimplantační a poimplantační biopsie, obr. 3). Pomocí metody kvantitativní real-time RT-PCR ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) jsme měřili expresi 92 kandidátních genů ve štěpech ledviny s okamžitým ( $n=26$ ) a opožděným ( $n=9$ ) rozvojem funkce štěpu.



Obr. 3. Časové provedení sekvenčních biopsií v průběhu odběru orgánu k transplantaci a samotné transplantace.

## Výsledky

Zatímco studená ischemie nevedla k významným změnám v expresním profilu kandidátních genů, došlo v průběhu reperfuze ke zvýšené expresi 16 genů asociovaných s aktivací přirozené a adaptivní imunitní odpovědi a apoptózy. Pomocí metody multivariantní logistické regrese jsme prokázali, že vyšší skóre pro tubulární atrofii (ct) ve spojení s nízkou expresí genu pro Netrin-1 může pomoci předpovědět opožděný rozvoj funkce štěpu (ROC AUC=0.89 pro testovací sadu, ROC AUC=0.81 pro validační sadu, obr. 4).



**Obr. 4 ROC křivka modelu logistické regrese pro predikci opožděného rozvoje funkce štěpu použitím kombinace genové exprese pro Netrin-1 a tubulární atrofii (ct) v dárcovské biopsii ledviny.**

Přerušovaná čára reprezentuje trénovací sadu (ROC AUC 0.89). Plná čára zobrazuje validaci použitím metody „leave-one-out“, 35x (průměrná ROC AUC 0.81). Tečkovaná čára zobrazuje ROC křivku pro samostatné prediktory- drobné tečky pro Netrin1 (ROC AUC 0.785) a velké tečky pro skóre pro tubulární atrofii (ROC AUC 0.637).

## Diskuse

Tato studie popsala histologické a molekulární změny ve třech po sobě jdoucích biopsiích provedených při odběru orgánu a v průběhu samotné transplantace. I přes absenci histologických abnormalit jsme pozorovali změněnou expresi genů ve vztahu k poškození štěpu. Ve srovnání s “molekulárním tichem” ischemie vedla reperfúze k enormním změnám transkriptomu, ke zvýšené aktivaci přirozené a adaptivní imunitní odpovědi a apoptózy a k významné heterogenitě transkripčního profilu v poimplantačních biopsiích. Možným vysvětlením molekulárního ticha během ischemie je potlačení metabolismu jako základního fyziologického mechanismu. Naše data naznačili, že molekulární profilování přesahuje hranice histopatologie. Použitím “molekulárního mikroskopu” jsme schopni odhalit i diskrétní změny, ke kterým dochází v průběhu ischemicko/reperfúzního poškození.

Primárním cílem této studie bylo identifikovat potencionální rizikové faktory DGF. Ledviny, u kterých došlo k opožděnému rozvoji funkce, vykazovaly vyšší skóre pro tubulární atrofii a nízkou expresi genou pro Netrin-1. Toto poukazuje na důležitou roli kvality tubulů v časném potransplantačním průběhu. Preexistující tubulární atrofie v dárcovské ledvině je obrazem ztráty tubulárních buněk následkem chronického poškození. I/RI spouští apoptózu, která preferenčně poškozuje tubulární buňky a vede k akutní tubulární nekróze. Apoptóza není jen příčinou buněčné smrti po I/RI ale přispívá i k zotavení z I/RI a tím zabezpečuje rovnováhu při excesivní proliferaci tubulárních buněk při regeneraci a nastolení tubulární integrity. Výkonná cesta apoptózy je potlačována tzv. faktory přežití. Jejich nedostatek spouští apoptózu, zatímco jejich dostupnost usnadňuje zotavení z I/RI. Mezi tzv. faktory přežití patří i Netrin-1, který napomáhá regeneraci tím, že stimuluje proliferaci přežívajících renálních tubulárních buněk a inhibuje apoptózu. Za normálních okolností je Netrin-1 ve zdravých tubulárních buňkách exprimovaný jen v minimálním množství. Jeho exprese v tubulárních buňkách narůstá při akutním poškození ledvin, ischemicko/reperfúzní poškození nevyjímaje. V naší práci jsme popsali sníženou expresi genu pro Netrin-1 ve štěpech s opožděným rozvojem funkce štěpu.

Domnívame se, že vyšetření exprese pro Netrin-1 by mohlo pomoci lépe porozumět vulnerabilitě dárcovské ledviny vůči I/RI, zvláště u ledvin od dárců s rozšířenými kritérii s již preexistujícím poškozením.

### **Závěr**

Pomocí molekulární a histologické analýzy dárcovských ledvin jsme zjistili, že nízká kvalita tubulárních buněk definována jako vyšší míra tubulární atrofie v kombinaci s redukováným potenciálem protiapoptotických faktorů přežití je spojená s opožděným rozvojem funkce transplantované ledviny. Netrin-1 patří mezi tzv. faktory přežití, které protektivně působí při zotavování z I/RI.

Na rozdíl od ischemie, byla reperfuze i přes minimální výskyt histopatologických abnormalit spojena se zvýšenou aktivací přirozené a adaptivní imunity a apoptózy. Lze tedy soudit, že kombinace konvenčních histopatologických metod s technikami molekulární patologie by mohla představovat účinný nástroj k identifikaci dárcovských ledvin v riziku opožděného rozvoje funkce.

### **Článek byl publikován v časopise *Transplantation*.**

Tubular atrophy and low netrin-1 gene expression are associated with delayed kidney allograft function. *Transplantation*. 2014 Jan 27;97(2):176-83.

*Kompletní znění článku je přiloženo v anglickém jazyce.*

# Tubular Atrophy and Low Netrin-1 Gene Expression Are Associated With Delayed Kidney Allograft Function

Mariana Wohlfahrtova,<sup>1,2</sup> Irena Brabcova,<sup>2</sup> Filip Zelezny,<sup>3</sup> Peter Balaz,<sup>4</sup> Libor Janousek,<sup>4</sup> Eva Honsova,<sup>5</sup> Alena Lodererova,<sup>5</sup> Peter Wohlfahrt,<sup>1</sup> and Ondrej Viklicky<sup>1,2,6</sup>

**Background.** Delayed graft function (DGF) caused by ischemia/reperfusion injury (I/RI) negatively influences the outcome of kidney transplantation. This prospective single-center study characterized the intrarenal transcriptome during I/RI as a means of identifying genes associated with DGF development.

**Methods.** Characterization of the intrarenal transcription profile associated with I/RI was carried out on three sequential graft biopsies from respective allografts before and during transplantation. The intragraft expression of 92 candidate genes was measured using quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) in delayed (n=9) and primary function allografts (n=26).

**Results.** Cold storage was not associated with significant changes to the expression profile of the target gene transcripts; however, up-regulation of 16 genes associated with enhanced activation of innate and adaptive immune responses and apoptosis was observed after reperfusion. Multivariate logistic regression analysis revealed that higher tubular atrophy scores (ct) together with a lower expression of Netrin-1 might predict DGF development (training area under the receiver operating curve=0.89, cross-validated area under the receiver operating curve=0.81).

**Conclusions.** Poor baseline tubular cell quality (defined by a higher rate of tubular atrophy) combined with the reduced potential of apoptotic survival factors represented by decreased Netrin-1 gene expression were associated with delayed kidney graft function.

**Keywords:** Renal transplantation, Gene expression, Netrin-1, TaqMan Low Density Array, Donor biopsy, Ischemia/reperfusion injury, Autophagy.

(*Transplantation* 2014;97: 176–183)

Utilization of kidney grafts obtained from elderly donors with hypertension, stroke as a cause of death and diabetes have increased due to lack of available organs. As a result, the risk of delayed graft function (DGF) has remained unchanged despite attempts to reduce the cold ischemia time, development of new perfusion solutions, and increasing usage of

machine perfusion. Delayed graft function is associated with poor kidney graft outcome and occurs in up to 33% of cases (1, 2). Main factors contributing to DGF include transplantation procedure-related injury combined with intrinsic donor factors, which in turn is associated with ischemia/reperfusion injury (I/RI). Therefore, a better definition of

This work was supported by grants given to O.V. from Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NS10516-3/2009, NT11227-5/2010, and MZO 00023001 and by grant from the Grant Agency of the Czech Republic P301/11/1568. E.Z. was supported by the Czech Science Foundation project P202/12/2032.

The authors declare no conflicts of interest.

<sup>1</sup> Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>2</sup> Transplant Laboratory, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>3</sup> Department of Cybernetics, Faculty of Electrical Engineering, Czech Technical University, Prague, Czech Republic.

<sup>4</sup> Department of Transplant Surgery, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>5</sup> Clinical and Transplant Pathology Department, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>6</sup> Address correspondence to: Ondrej Viklicky, M.D., Ph.D., Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 14021 Prague, Czech Republic.

E-mail: [ondrej.viklicky@ikem.cz](mailto:ondrej.viklicky@ikem.cz)

M.W. contributed to the hypothesis forming, data collection, expression and statistical data analysis and article writing. I.B. contributed to the expression data analysis. E.Z. contributed to the statistical data analysis. P.B. and L.J. contributed to the data collection. E.H. contributed to the histological evaluation of samples. A.L. contributed to the immunohistological evaluation of samples. P.W. contributed to the data analysis. O.V. contributed to the hypothesis forming, grant funding, results interpretation, and article writing.

Part of the work was presented at the American Transplant Congress 2012 in Boston.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site ([www.transplantjournal.com](http://www.transplantjournal.com)).

Received 15 April 2013. Revision requested 9 May 2013.

Accepted 15 August 2013.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/14/9702-176

DOI: 10.1097/TP.0b013e3182a95d04



donor kidney quality and understanding of the processes associated with I/RI and DGF are needed.

Conventional donor kidney histological evaluations alone have been shown to be imperfect in assessing donor graft quality and in predicting graft outcomes (3). While histological characteristics associated with kidney injury are typically less well defined, different gene regulation was suggested to be implicated in molecular responses that precede the development of histological abnormalities (4). Moreover, gene expression analysis of kidney graft biopsies may help identify novel potential biomarkers associated with DGF.

Microarray analyses in animal models have identified molecular changes associated with I/RI (5, 6). However, similar analyses in humans have only resulted in the identification of novel candidate genes associated with I/RI and DGF (4, 7, 8). In these studies, I/RI was described as an aggregate injury caused by both ischemia and reperfusion, respectively, based on the analysis of biopsy materials obtained from zero hour (9–11), preimplantation (4), or postimplantation biopsies (8).

Therefore, the primary aim of this prospective single-center study was to assess the role of both morphological changes and expressions of 92 genes known to be implicated in I/RI during particular phases of I/RI and in the prediction of DGF after kidney transplantation.

## RESULTS

### Demographic Data

Three sequential kidney graft biopsies were performed from 38 consecutive deceased kidney transplants. Twenty-six recipients (68.4%) developed primary graft function (PGF) and 12 (31.6%) developed DGF. To analyze I/RI in patients undergoing uncomplicated kidney transplantation and to identify risk factors associated with DGF in the context of baseline donor organ quality, three patients with expected DGF due to complications during the surgery were excluded (cardiopulmonary resuscitation for severe bradycardia during surgery [n=1] and poor graft perfusion due to technical complications [n=2]). No patient showed histological signs of rejection in biopsies examined during the first week after transplantation. Donor and recipient demographics are described in SDC, Table S1, at <http://links.lww.com/TP/A884>. Kidney recipients were followed prospectively for 1 year. Renal function expressed as estimated glomerular filtration rate-Modification of Diet in Renal Disease Formula (eGFR-MDRD) was significantly different between recipients with and without DGF at 1 week, 1 month, and 1 year after transplantation ( $P<0.001$ ,  $P<0.05$ , and  $P<0.001$ , respectively).

### Molecular Evaluation of Kidney Biopsies

#### Molecular Changes Associated With Renal Ischemia

None of the evaluated genes were significantly differentially regulated after ischemia except for two genes that were down-regulated with borderline significance: matrix metalloproteinase 9 (*MMP9*) (14–16) and complement component 3 (*C3*);  $1/n$ -fold of RQ median in  $T_1$  biopsy versus  $T_0$  biopsy=5.82 and 2.42, respectively;  $P=0.07$  for both genes after adjusting for multiple comparisons.

#### Molecular Changes Associated With Renal Reperfusion

In contrast to the relatively few changes observed in the expression profiles for the analyzed genes after ischemic injury, reperfusion injury was associated with a significant up-regulation of 16 genes associated with inflammation and apoptosis (Tables 1 and 2). Although innate immune responses such as the NOD-like receptor and Toll-like receptor signaling pathways were activated after reperfusion, a predominant up-regulation in adaptive immune responses was observed. B cell and T cell ( $P=7.91e-15$  and  $6.40e-05$ , respectively), cytokine–cytokine receptor interaction pathways ( $P=5.96e-04$ ), genes involved in allograft rejection ( $P=2.30e-03$ ), and genes involved in natural killer cell–mediated cytotoxicity ( $P=3.55e-03$ ) were activated after reperfusion.

#### Histological Abnormalities Associated With DGF

Particular Banff scores were comparable in baseline donor biopsies ( $T_0$ ) across the studied groups based on graft function development except for the rate of tubular atrophy (ct) that was slightly higher in the DGF group compared to the PGF group ( $P=0.07$ ). The incidence of vascular nephrosclerosis, degree of interstitial fibrosis and glomerular sclerosis, and Remuzzi score were not different between the DGF and PGF groups (Table 3). Histological evaluation of preimplantation ( $T_1$ ) and postimplantation ( $T_2$ ) biopsies supported the above results after comparison between the studied groups (data not shown).

#### Molecular Changes Associated With DGF

To detect subtle changes associated with donor brain death and I/RI, we compared kidney allograft biopsy gene

**TABLE 1.** Genes up-regulated after reperfusion

Gene	$P^a$	$n$ -fold
<i>CD69</i>	2.06e-06	5.63
<i>CDKN1A</i>	4.82e-04	2.14
<i>CXCL1</i>	1.17e-02	2.22
<i>CYR61</i>	1.60e-05	4.34
<i>EGR1</i>	2.06e-06	12.70
<i>FOS</i>	1.33e-10	53.92
<i>FOSL1</i>	6.69e-04	2.83
<i>HSPA1A</i>	2.06e-06	6.34
<i>IFNG</i>	1.60e-05	9.39
<i>IL6</i>	4.04e-04	5.64
<i>IL8</i>	2.95e-03	2.9
<i>IL10</i>	4.75e-04	5.60
<i>IL12A</i>	3.1e-02	2.13
<i>PTGS2</i>	4.75e-04	4.34
<i>SELE</i>	4.94e-02	2.53
<i>TNF</i>	9.71e-04	2.55

<sup>a</sup>Mann-Whitney *U* test with adjustment for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg correction.

Only differentially expressed genes fulfilling statistical and biological significance criteria are shown.

Data in the right column represent  $n$ -fold difference comparing gene expression in  $T_2$  biopsy versus  $T_1$  biopsy. Significant biological difference was defined by at least a more than two-fold difference in gene expression.

**TABLE 2.** Functional classification of sixteen transcripts shown to be up-regulated after reperfusion

Biological pathway	Genes annotated	P <sup>a</sup>
B-cell receptor signaling pathway	<i>FOS</i>	7.91e-15
MAPK signaling pathway	<i>HSPA1A, FOS, TNF</i>	2.56e-12
Toll-like receptor signaling pathway	<i>FOS, IL12, TNE, IL6, IL8</i>	4.93e-06
T-cell receptor signaling pathway	<i>IL10, IFNG, FOS, TNF</i>	6.40e-05
Antigen processing and presentation	<i>HSPA1A</i>	1.20e-04
Proteasome	<i>IFNG</i>	1.34e-04
Cytokine-cytokine receptor interaction	<i>IFNG, IL12A, CXCL1, IL6, IL8, IL10, TNF</i>	5.96e-04
Cytosolic DNA sensing pathway	<i>IL6</i>	6.88e-04
JAK-STAT signaling pathway	<i>IL10, IFNG, IL12A, IL6</i>	6.88e-04
Endocytosis	<i>HSPA1A</i>	7.68e-04
NOD-like receptor signaling pathway	<i>CXCL1, TNE, IL6, IL8</i>	1.08e-03
Intestinal immune network for IgA production	<i>IL10, IL6</i>	1.65e-03
Allograft rejection	<i>TNE, IL10, IFN, IL12A</i>	2.30e-03
Natural killer cell-mediated cytotoxicity	<i>IFNG, TNF</i>	3.55e-03

<sup>a</sup> According to Global test with adjustment for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg correction.

expression profiles of selected candidate genes at  $T_0$ ,  $T_1$ , and  $T_2$  from patients with DGF and PGF. The renal gene expression profile at  $T_0$  was similar for DGF and PGF grafts. However, a higher Netrin-1 (*NTN1*) (16) expression level in donor kidneys that subsequently develop PGF was observed (lnRQ=0.52 [-0.54 to 1.14] in PGF vs. lnRQ=-0.47 [-7.23 to 0.28] in DGF,  $P=0.02$ ;  $n$ -fold RQ PGF vs. DGF=3.77) (Fig. 1A). In  $T_1$  biopsies of PGF, alpha-1-microglobulin (*AMBPI*), an adrenomedullin-binding protein with the potential to attenuate organ injury and organ inflammatory response (17–20), showed significantly higher expression levels compared with expression levels observed in patients with DGF (lnRQ=0.05 [-0.67 to 0.37] in PGF vs. lnRQ=-0.76 [-1.19 to -0.09] in DGF,  $P=0.02$ ;  $n$ -fold RQ PGF vs. DGF=2.25). In  $T_2$  biopsies, the higher *NTN1*

expression levels also separated organs with PGF from those with DGF (lnRQ=-0.22 [-1.44 to 0.32] in PGF vs. lnRQ=-1.77 [-9.2 to 0.38] in DGF,  $P=0.04$ ;  $n$ -fold RQ PGF vs. DGF=4.72) (Fig. 1C). When performing analysis on the complete data set (including samples from all three biopsies), a significant down-regulation of *NTN1*, *AMBPI*, and caspase 9 (*CASP9*) was observed in DGF samples ( $P=0.05$ , one-sided test after Benjamini-Hochberg adjustment for multiple testing).

#### Immunohistochemical Evaluation for Netrin-1 Associated With DGF

The role of *NTN1* in DGF was further confirmed at the protein level in  $T_0$  and  $T_2$  biopsy specimens. Moreover, immunohistochemical (IHC) evaluation showed higher

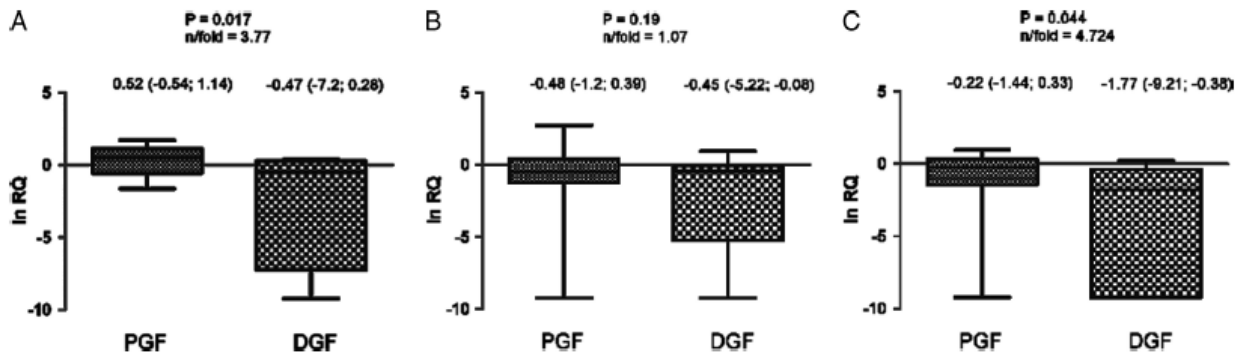
**TABLE 3.** Histological evaluation of baseline donor kidney biopsies according to Banff 07 classification

	All (n=35)	DGF (n=9)	PGF (n=26)
Glomerulitis (g)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
Glomerulopathy (cg)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
Mesangial matrix increase (mm)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
Tubulitis (t)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
Interstitial inflammation (i)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
Intimal arteritis (v)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
Tubular atrophy (ct)	1 (1–1)	1 (1–1.25)	1 (1–1) <sup>a</sup>
Interstitial fibrosis (ci)	1 (1–1)	1 (0.5–1.25)	1 (0.75–1)
Fibro-intimal thickening (cv)	1 (0–1)	1 (0.5–1.5)	1 (0–1)
Arteriolar hyalinosis (ah)	2 (1–2)	2 (1.25–2)	1 (1–2)
Interstitial fibrosis (% of sample)	10 (5–20)	20 (10–25)	10 (5–20)
Glomerular sclerosis (% of sample)	10 (2.7–15)	12.65 (4.3–20.7)	7.1 (1.75–14.6)
Vascular nephrosclerosis (n)	24 (68.6%)	7 (77.8%)	17 (65.4%)
Remuzzi score ( $x/12$ ) <sup>b</sup>	4 (3–5)	4.5 (4–5.75)	4 (2.5–5)

<sup>a</sup>  $P=0.07$  for the comparisons between DGF and PGF group.

<sup>b</sup> Remuzzi score system was used to quantify the percentage of glomerular sclerosis, tubular atrophy, interstitial fibrosis, and arteriolar stenosis. Continuous data are expressed as median (interquartile range) values and categorical data presented as counts (%).





**FIGURE 1.** Box and whisker plots of differential *NTN1* gene expression between kidney grafts with primary (PGF) and delayed (DGF) graft function at  $T_0$  (A),  $T_1$  (B), and  $T_2$  (C) biopsies. Box plots and numbers given depict the median and the interquartile ranges of the lnRQ measured in the quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. A value of zero equates expression levels similar to the reference RNA.

intensity and higher numbers of positive tubular epithelial cells (mainly in the proximal tubules) in staining with anti-Netrin-1 antibody in cases with PGF compared to DGF grafts (Figure S1, SDC, at <http://links.lww.com/TP/A884>).

### The Role of Tubular Damage in DGF

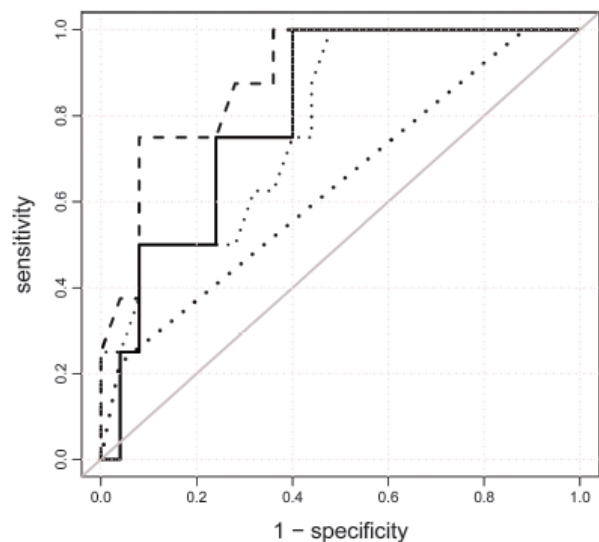
Since kidney proximal tubules are most vulnerable to I/RI (21) and tubular damage was associated with DGF in our study, the hypothesis that the tubular atrophy score (ct) combined with the Netrin-1 expression was predictive of DGF was tested. Intragraft gene expression of Netrin-1, known from univariate analyses to be significantly lower in DGF along with ct score (that was borderline significant,  $P=0.07$ ) in  $T_0$  biopsies were selected as predictor variables for training a logistic regression model parameterized on the donor biopsy data. This model achieved an area under the receiver operating curve (AUC, or  $c$ -statistic of 0.89) indicating a significant separation between DGF and PGF (Fig. 2, *dashed line*). To estimate how well the model generalizes, we repeatedly fit and tested the model using a leave-one-out (35-fold) cross-validation procedure. The average AUC (Fig. 2, *solid line*) resulting from this validation protocol was 0.81, confirming good discrimination power of this pair of predictors with respect to DGF.

In addition, we performed Spearman correlation analysis and demonstrated weak but negative correlation between the level of Netrin-1 and the duration of DGF ( $\rho=-0.284$ ,  $P=0.004$ ), which support the strength of Netrin-1 as a relevant biomarker of DGF.

### Principal Component Analysis

Principal component analysis (PCA) is a mathematical procedure that reduces high dimensionality to two dimensions. Briefly, samples with similar gene expression profiles appear close to each other in the PCA diagram, while dissimilar samples are mutually more distant. Principal component analysis was calculated on the entire data set ( $n=105$  cases). Significant overlap between DGF and PGF samples as well as between the respective biopsy groups (three sequential biopsies, i.e.,  $T_0$ ,  $T_1$ , and  $T_2$ ) was observed (Figure S2, SDC, at <http://links.lww.com/TP/A884>), suggesting that it was not possible to discriminate between the respective groups through

PCA. Visual inspection of the PCA diagram also suggests that sample heterogeneity within biopsy groups grows over time, that is,  $T_2$  biopsies were more distantly spaced than  $T_1$  biopsies, which in turn are more spread than  $T_0$  biopsies. We verified this trend on the original (pre-PCA) data by computing all pairwise Euclidean distances (dissimilarities) between samples (real-valued vectors of expression) within each of the three biopsy groups. On the basis of a nonparametric Wilcoxon test, the mean of these distances (i.e., the heterogeneity) was significantly ( $P<0.001$ ) smaller in  $T_0$  group



**FIGURE 2.** Receiver operating curve (ROC) of the logistic regression model. Discrimination for DGF after kidney transplantation using a combination of *NTN1* gene expression and tubular atrophy scores (ct) of donor biopsies. *Dashed line* represents training data set (area under the ROC=0.89). *Solid line* represents the leave-one-out (35-fold) cross-validation procedure (average area under the ROC=0.81). *Dotted line* represents ROC curves for single predictors: *small dots* for *NTN1* (area under the ROC=0.785) and *large dots* for tubular atrophy score (ct) (area under the ROC=0.637).

than in  $T_1$  group, and significantly ( $P < 0.001$ ) smaller in the  $T_1$  group than in the  $T_2$  group. This result reflects growing sample heterogeneity from  $T_0$  through  $T_1$  and then to  $T_2$  biopsies. While donor kidneys are quite homogenous at the time of organ procurement, I/RI leads to increased transcriptome diversity between allografts suggesting different organ vulnerability to ischemia and reperfusion.

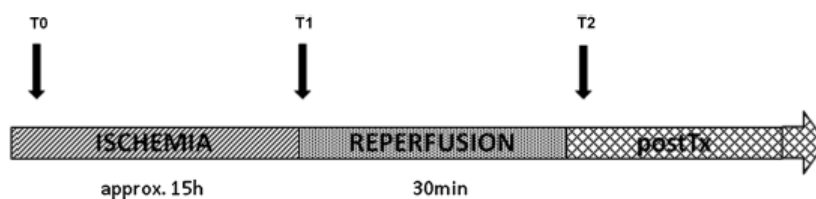
## DISCUSSION

This study established that donor kidney tubular cell atrophy and Netrin-1 gene and protein expression levels were associated with DGF of renal allografts. Moreover, this study was the first to describe in detail molecular changes occurring in three consecutive biopsies taken during organ procurement and transplantation as a means of identifying molecular events associated with either ischemia or reperfusion injury. Despite the absence of changes in histological abnormalities during I/RI, we found altered expression levels of genes associated with kidney graft injury. While cold storage did not lead to significant changes in the level of expression of the evaluated gene transcripts, reperfusion was associated with enhanced activation of innate and adaptive immune responses and apoptotic programs. These data demonstrated that reperfusion was associated with more enormous changes to the transcriptome in comparison with ischemia as visually shown by PCA where gene expression heterogeneity increased over time, with the highest heterogeneity observed in postimplantation biopsies. The possible explanation for the molecular silence during the ischemia is suppression of metabolism as the basic physiological mechanism during the hibernation. It is well known that acute kidney injury is characterized by a dissociation of pathology and physiology (22, 23). Our data provided quantitative measurements of inflammation and immune activation after reperfusion and support data suggesting that molecular profiling goes beyond histopathology by characterizing a discrete set of transcripts activated by I/RI (24). Molecular events found in postimplantation ( $T_2$ ) biopsies reflect acute tissue injury and repair otherwise not detectable microscopically. Proinflammatory responses are likely to be the consequence of reperfusion as observed in  $T_2$  biopsies and may augment tissue injury in excess of that produced by ischemia alone (25).

During the reperfusion, there were several transcripts up-regulated. The most significant ones were *FOS*, *TNF*, and *HSPA1A*. The *FOS* proteins have been implicated as regulators of cell proliferation, differentiation, and transformation and also involved in apoptosis. Tumor necrosis factor (*TNF*) is a cytokine mainly involved in the regulation of a wide spectrum of biological processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis, lipid metabolism, and coagulation. Heat shock 70 kDa protein 1 (*HSP*) is a protein that in humans is encoded by the *HSPA1A* gene. The protein stabilizes existing proteins against aggregation and mediates the folding of newly translated proteins in the cytosol and in organelles. All three genes have been shown to play some role in autophagy, which is an essential, conserved lysosomal degradation pathway that controls the quality of the cytoplasm by eliminating protein aggregates and damaged organelles. Moreover, autophagy likely plays an important role in normal proximal tubule function and recovery from acute ischemic kidney injury (26, 27).

The primary aim of this study was to identify potential risk factors associated with DGF. However, no associations between donor, recipient, organ procurement, surgery conditions, and DGF development were found. However, tubular atrophy scores were higher among donor kidneys that developed DGF. Besides severe tubular atrophy, the lower messenger RNA expression of Netrin-1 was observed in both  $T_0$  and  $T_2$  biopsies in patients who suffered from DGF. This indicated the importance of tubular quality in the context of posttransplant outcomes. It was shown that preexisting renal tubular atrophy in donor kidney reflected tubular cell loss after chronic renal insult (28). I/RI triggers apoptosis that predominantly affects tubular epithelial cells resulting in acute tubular necrosis. Apoptosis is not only an important cause of a cell death immediately after I/RI but also contributes to recovery from I/RI by providing a balance between excessive renal cell proliferation associated with the process of replacing irreversibly injured tubular epithelial cells and restoring tubular integrity (29). In the event of apoptotic cell death exceeding mitotic replacement, renal cell loss results in tubular atrophy (30). The effector apoptotic pathway is constantly suppressed by survival factors. Their deficiency triggers apoptosis while their availability facilitates recovery from ischemic injury (31). Netrin-1 facilitates recovery from ischemic injury by stimulating the proliferation of surviving renal tubular cells and inhibition of apoptosis (32). Normally, Netrin-1 is not expressed (or is present at low levels) in healthy tubular epithelial cells (16) but is expressed in tubular cells during recovery from ischemia. In addition, Netrin-1 expression levels are significantly elevated in urine of patients with various forms of acute kidney injury including ischemic injury (16, 33, 34). The beneficial effects of Netrin-1 on the suppression of tissue injury were first described in mice (34, 35). One of the most interesting findings described in our report was higher expression of Netrin-1 in PGF compared to DGF grafts in  $T_0$  biopsies as well as in  $T_2$  biopsies. Renal tubular cell apoptosis induced by acute I/RI, especially in combination with preexisting chronic tubular atrophy, was associated with a higher incidence of DGF (36, 37). The worse short-term outcomes after deceased versus live donor transplant kidneys are due to impaired tubular counterbalance of oxidative stress at the time of implantation (38). Despite the inconsistent conclusions regarding the effects of the donor kidney biopsy's predictive value (39), a large study examining expanded criteria donors showed that kidney allocation based on histological evaluation of donor biopsies (40), eventually combining with donor and recipient risk factors, helped improve graft survival (41). Here we suggest that Netrin-1 gene expression might help to better understand vulnerability to I/RI, especially in expanded criteria donor kidneys with preexisting chronic changes that are uniquely susceptible to I/RI because of older donor age, comorbidities, and terminal effects of brain death on kidneys with limited functional reserve. Moreover, recently it was shown that Netrin-1 stimulates *HSP*, a gene associated with autophagy and thus contributes to the protection of hypoxia-induced apoptosis via the inhibition of mitochondrial dysfunction (42). Therefore, it is likely that higher autophagy-related gene transcripts may be associated with the reduction of DGF.





**FIGURE 3.** Biopsy strategy. To investigate changes to the intrarenal transcription profile during I/RI, three sequential biopsies were performed during organ procurement and transplantation: donor biopsy ( $T_0$ ), preimplantation biopsy ( $T_1$ ), and postimplantation “30-min” ( $T_2$ ) biopsy. Comparisons of  $T_1$  biopsy with  $T_0$  biopsy and comparisons of  $T_2$  with  $T_1$  were carried out to look for changes reflecting the ischemia and reperfusion period, respectively.

There are some limitations that need to be acknowledged and addressed regarding the present study. In our study, we adhered to statistical rigor when identifying differentially expressed genes. The genes considered to be differentially expressed had to fulfill not only statistical significance but also biological significance when minimal cutoff for differential expression was two-fold. We were unable to discriminate between DGF and PGF grafts after target gene analysis as shown by PCA. This observation suggested limitations in the target genes selected, suggesting that other yet-to-be-defined molecules likely contributed to the pathogenesis of DGF. The sample size might appear as relatively small. However, the value of this study includes the molecular analysis of 92 target genes in 105 samples of repeated three consecutive biopsies taken during organ procurement and transplantation in 35 human donor kidneys. Furthermore, we were not able to discriminate a role of recipient blood leukocytes during reperfusion on analyzed genes expression.

In conclusion, analysis of donor kidneys identified poor tubular cell quality and low Netrin-1 expression levels to be associated with DGF. Netrin-1 is a survival factor that plays a protective role in recovery from I/RI. In the future, targeted therapeutic intervention might help to decrease the incidence of DGF in organs susceptible to I/RI. Despite minimal histopathological abnormalities occurring during reperfusion injury, reperfusion was associated with enhanced activation of innate and adaptive immune responses and apoptotic programs, contrary to relative molecular silence of ischemia. Taking together, the combination of both conventional histology and molecular pathology techniques during transplantation surgery may represent a more accurate tool to discriminate grafts at risk for DGF.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design and Patients

Allograft biopsy specimens from 38 deceased donor kidneys that were consecutively allocated to transplant recipients at our center between October 2009 and June 2010 were used in this study. Transplant recipients participating in concurrent immunosuppressive drug studies and patients with a bleeding history were not included. The study was performed in accordance with guidelines established by the Declaration of Helsinki, and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine. Informed consent was obtained from all patients (IRB approval number F2002/08).

### Definition of DGF

Delayed graft function was defined as the need for dialysis during the first week after transplantation (except dialysis for hyperkalemia or volume overload in the first 24 hr) (2, 43).

### Study Biopsies

To investigate changes in the intrarenal transcription profile during I/RI, three sequential biopsies were performed during organ procurement and transplantation, that is, at the time the kidney was procured (baseline donor,  $T_0$ ), preimplantation biopsy ( $T_1$ ), and postimplantation “30-min” ( $T_2$ ) biopsy:

1. The “ $T_0$ ” biopsy is the standard intraoperative, subcapsular donor wedge biopsy obtained at the time of kidney procurement right after perfusion with 4°C histidine-tryptophan ketoglutarate preservation solution.
2. The “ $T_1$ ” biopsy was taken during the transplantation surgery at the back table at the end of cold ischemia time just before reperfusion using a sterile 14-gauge biopsy needle, reflecting molecular and structural changes during cold ischemia.
3. The “ $T_2$ ” biopsy was performed 30 min after release of the vascular clamps allowing for the detection of reperfusion changes in the allograft. The core of the biopsy specimen cortical zone was placed immediately in RNAlater stabilization reagent (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at 4°C overnight and then cooled to  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA was extracted.

### Histological Evaluation of Kidney Biopsies

Histological evaluation of donor biopsies at baseline was carried out according to the 2005 Banff working classification criteria (Table 3) (12). The median Remuzzi score (13) used to quantify donor kidney quality was 4 of 12. We did not observe any changes in histological abnormalities or histopathological signs of inflammation in preimplantation or postimplantation biopsies (data not shown).

### Molecular Evaluation of Kidney Biopsies

To investigate changes in the intrarenal transcription profile during ischemia phase of I/RI, we compared the expression profile of the preimplantation biopsy ( $T_1$ ) with the donor biopsy ( $T_0$ ). In a similar fashion, by comparing the postimplantation ( $T_2$ ) and preimplantation biopsies ( $T_1$ ), the reperfusion period was characterized (Fig. 3).

### Gene Probe Set Selection

The expression profile of 92 candidate genes was used to evaluate injury and repair signals associated with organ procurement and reperfusion. Studied genes included genes associated with apoptosis, innate and adaptive immunity, and oxidative stress signaling. We identified target genes potentially associated with graft function development on the basis of available published work describing complementary DNA microarray and reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction analyses (Table S2, SDC, at <http://links.lww.com/TP/A884>). Housekeeping genes were selected based on expression stability (Figure S3, SDC, at <http://links.lww.com/TP/A884>). Additional supporting information on real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis, expression data analysis, immunohistochemistry, and immunosuppressive treatment of recipients may be found in the online version of this article (Materials and Methods, SDC, at <http://links.lww.com/TP/A884>).

### Statistical Analysis

For demographic and the gene expression data, nonparametric testing was performed, and data were expressed as median and interquartile range

values. Continuous clinical variables were compared using the Mann-Whitney *U* test, and categorical variables were compared using the Fisher exact test. Significance was established by two-sided *P* values <0.05 unless otherwise specified. The Benjamini-Hochberg adjustment was used when appropriate. Only genes that fulfilled the selection criteria (combination of both statistical and biological significance criteria; *P*<0.05, at least two-fold gene expression difference between studied groups, respectively) were considered as significantly differentially expressed. Additional supporting information on multivariable logistic regression, leave-one-out cross-validation procedure, receiver operating curve analysis, functional interpretation of genes, and principal component analysis (PCA) may be found in the online version of this article (Supplemental Digital Content, Materials and Methods).

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the transplantation coordinators, nurses, and patients for their cooperation and help. Special thanks goes to Romana Polackova for expert technical assistance and Vera Polackova for her help with data collection.

### REFERENCES

- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, et al. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 968.
- Halloran PF, Hunsicker LG. Delayed graft function: state of the art, November 10–11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *Am J Transplant* 2001; 1: 115.
- El-Husseini A, Sabry A, Zahran A, et al. Can donor implantation renal biopsy predict long-term renal allograft outcome? *Am J Nephrol* 2007; 27: 144.
- Mas VR, Archer KJ, Yanek K, et al. Gene expression patterns in deceased donor kidneys developing delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 2008; 85: 626.
- Yoshida T, Kurella M, Beato F, et al. Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int* 2002; 61: 1646.
- Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, et al. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2003; 63: 1714.
- Hauser P, Schwarz C, Mitterbauer C, et al. Genome-wide gene-expression patterns of donor kidney biopsies distinguish primary allograft function. *Lab Invest* 2004; 84: 353.
- Mueller TF, Reeve J, Jhangri GS, et al. The transcriptome of the implant biopsy identifies donor kidneys at increased risk of delayed graft function. *Am J Transplant* 2008; 8: 78.
- Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, et al. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 74: 916.
- Avihingsanon Y, Ma N, Pavlakis M, et al. On the intraoperative molecular status of renal allografts after vascular reperfusion and clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1542.
- Perco P, Kainz A, Wilflingseder J, et al. Histogenomics: association of gene expression patterns with histological parameters in kidney biopsies. *Transplantation* 2009; 87: 290.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753.
- Remuzzi G, Grinyo J, Ruggenti P, et al. Early experience with dual kidney transplantation in adults using expanded donor criteria. Double Kidney Transplant Group (DKG). *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2591.
- Basile DP, Fredrich K, Wehrauch D, et al. Angiostatin and matrix metalloproteinase expression following ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: 893.
- Viappiani S, Sariahmetoglu M, Schulz R. The role of matrix metalloproteinase inhibitors in ischemia-reperfusion injury in the liver. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2923.
- Urbschat A, Obermuller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers* 2011; 16(Suppl 1): S22.
- Shah KG, Rajan D, Jacob A, et al. Attenuation of renal ischemia and reperfusion injury by human adrenomedullin and its binding protein. *J Surg Res* 2010; 163: 110.
- Yang J, Wu R, Qiang X, et al. Human adrenomedullin and its binding protein attenuate organ injury and reduce mortality after hepatic ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 2009; 249: 310.
- Chang WW, Wu R, Ji Y, et al. Peripheral administration of human adrenomedullin and its binding protein attenuates stroke-induced apoptosis and brain injury in rats. *Mol Med* 2011; 17: 1075.
- Carrizo GJ, Wu R, Cui X, et al. Adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 downregulate inflammatory cytokines and attenuate tissue injury after gut ischemia-reperfusion. *Surgery* 2007; 141: 245.
- Molitoris BA, Wagner MC. Surface membrane polarity of proximal tubular cells: alterations as a basis for malfunction. *Kidney Int* 1996; 49: 1592.
- Schlondorff DO. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Int* 2008; 74: 860.
- Rosen S, Stillman IE. Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 871.
- Mueller TF, Solez K, Mas V. Assessment of kidney organ quality and prediction of outcome at time of transplantation. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 185.
- Kurian SM, Flechner SM, Kaouk J, et al. Laparoscopic donor nephrectomy gene expression profiling reveals upregulation of stress and ischemia associated genes compared to control kidneys. *Transplantation* 2005; 80: 1067.
- Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, et al. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 902.
- Singh KK, Yanagawa B, Quan A, et al. Autophagy gene fingerprint in human ischemia and reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 2013 [Epub ahead of print].
- Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 1996; 271: 477.
- Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (Suppl 1): S55.
- Mullen TD, Jenkins RW, Obeid LM, et al. Apoptosis in the kidney. In: Reed JC, Green DR, eds. *Apoptosis: Physiology and Pathology*. Cambridge, England: Cambridge University Press, 2011: 242.
- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397.
- Wang W, Reeves WB, Pays L, et al. Netrin-1 overexpression protects kidney from ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis. *Am J Pathol* 2009; 175: 1010.
- Reeves WB, Kwon O, Ramesh G. Netrin-1 and kidney injury. II. Netrin-1 is an early biomarker of acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: 731.
- Wang W, Reeves WB, Ramesh G. Netrin-1 and kidney injury. I. Netrin-1 protects against ischemia-reperfusion injury of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: 739.
- Wu TW, Li WW, Li H. Netrin-1 attenuates ischemic stroke-induced apoptosis. *Neuroscience* 2008; 156: 475.
- Oberbauer R, Rohrmoser M, Regele H, et al. Apoptosis of tubular epithelial cells in donor kidney biopsies predicts early renal allograft function. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2006.
- Ueda N, Shah SV. Tubular cell damage in acute renal failure—apoptosis, necrosis, or both. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 318.
- Kainz A, Mitterbauer C, Hauser P, et al. Alterations in gene expression in cadaveric vs. live donor kidneys suggest impaired tubular counterbalance of oxidative stress at implantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1595.
- Sung RS, Christensen LL, Leichtman AB, et al. Determinants of discard of expanded criteria donor kidneys: impact of biopsy and machine perfusion. *Am J Transplant* 2008; 8: 783.
- Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, et al. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med* 2006; 354: 343.
- Anglicheau D, Loupy A, Lefaucheur C, et al. A simple clinico-histopathological composite scoring system is highly predictive of graft outcomes in marginal donors. *Am J Transplant* 2008; 8: 2325.



42. Son TW, Yun SP, Yong MS, et al. Netrin-1 protects hypoxia-induced mitochondrial apoptosis through HSP27 expression via DCC- and integrin  $\alpha_6\beta_4$ -dependent Akt, GSK-3 $\beta$ , and HSF-1 in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis* 2013; 4: 563.
43. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, et al. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 2995.
44. Urbanova M, Brabcova I, Girmanova E, et al. Differential regulation of the nuclear factor-kappaB pathway by rabbit antithymocyte globulins in kidney transplantation. *Transplantation* 2012; 93: 589.
45. Sanchez-Espiridion B, Sanchez-Aguilera A, Montalban C, et al. A TaqMan lowdensity array to predict outcome in advanced Hodgkin's lymphoma using paraffin-embedded samples. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1367.
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001; 25: 402.
47. Collette S, Collette L, Budiharto T, et al. Predictors of the risk of fibrosis at 10 years after breast conserving therapy for early breast cancer: a study based on the EORTC Trial 22881-10882 'boost versus no boost'. *Eur J Cancer* 2008; 44: 2587.
48. Holec M, Klema J, Zelezny F, et al. Comparative evaluation of set-level techniques in predictive classification of gene expression samples. *BMC Bioinformatics* 2012; 13(Suppl 10): S15.
49. Goeman JJ, Buhlmann P. Analyzing gene expression data in terms of gene sets: methodological issues. *Bioinformatics* 2007; 23: 980.
50. Goeman JJ, VdGS, van Houwelingen HC. Testing against a high dimensional alternative. *J R Statist Soc B* 2006; 68: 477.

## **6.2 Identifikace ledvin od dárců s rozšířenými kritérii v riziku opožděného rozvoje funkce štěpu**

### **Úvod**

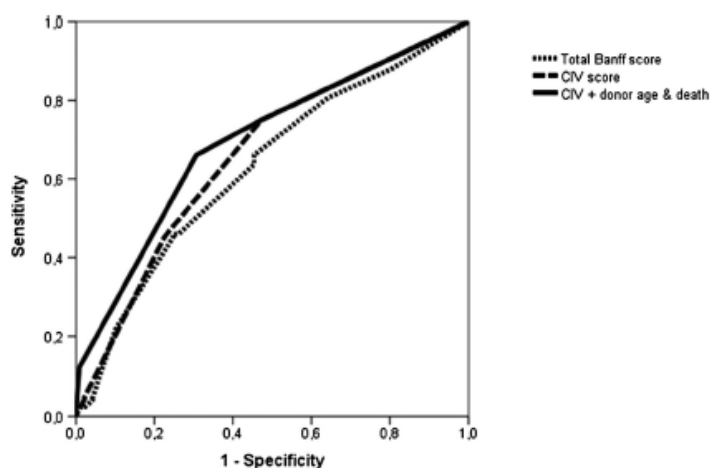
Nedostatek orgánů vede ke zvýšenému využití ledvin od dárců s rozšířenými kritérii, tzv. ECD dárců, což přispívá k vyššímu riziku opožděné funkce štěpu. Cílem této práce bylo identifikovat ledviny v riziku DGF.

### **Metodika**

K predikci rizika DGF po transplantaci ledviny jsme použili histologické hodnocení dárcovské renální biopsie a klinickou charakteristiku dárce a příjemce. Souhrnné Banffské skóre spočívalo v součtu skóre pro intersticiální fibrózu (CI), tubulární atrofii (CT), hyalinní ztlustění arteriol (AH), fibrózní ztlustění intimy (CV) a procentuální zastoupení sklerotizovaných glomerulů (GS).

### **Výsledky**

K opožděnému rozvoji funkce štěpu po transplantaci ledviny došlo ve sledovaném období u 126 pacientů z 344. U těchto pacientů jsme našli vyšší histologické skóre pro intersticiální fibrózu (CI), tubulární atrofii (CT), fibrózní ztlustění intimy (CV) a souhrnné Banffské skóre, přičemž jako nezávislé prediktory DGF se jeví jen CI a CV. Součtem CI + CV jsme vytvořili nové CIV skóre, které lépe predikuje DGF (OR 2.68; 95% confidence interval, 1.55-4.66;  $P < 0.001$ ), než souhrnné Banffské (OR, 1.48; 95% confidence interval 0.85-2.55;  $P = \text{NS}$ ). Kombinace CIV skóre s klinickými parametry dárce (věk + příčina úmrtí) zlepšila predikci DGF (podrobnosti viz obr. 5). U ledvin s CIV skóre  $\geq 1$  od dárce staršího 51 let a s anoxickým poškozením mozku bylo riziko DGF nejvyšší. Naopak, ECD dárce s CIV skóre  $< 1$  představovali podskupinu dárců v nejnižším riziku DGF, které bylo porovnatelné s rizikem DGF u ledvin od dárců se standardními kritérii (SCD, z angl. standard criteria donor) (29.3% vs. 28.4%).



	AUC (95% CI)		p
Total Banff score	0.626 (0.573 – 0.678)	Total Banff score AUC vs. CIV AUC	0.051
CIV	0.659 (0.606 – 0.710)	Total Banff score AUC vs. CIV + donor age & death AUC	0.002
CIV + donor age & death	0.694 (0.642 – 0.743)	CIV AUC vs. CIV + donor age & death AUC	0.027

**Obr. 5 ROC analýza predikce opožděného rozvoje funkce štěpu pomocí souhrnného Banffského skóre, CIV skóre a kombinace CIV skóre s věkem dárce a příčinou úmrtí.**

Pozorovali jsme hraniční rozdíl v síle predikce DGF mezi souhrnným Banffským skóre (ROC AUC 0.626) a CIV skóre (ROC AUC 0.659,  $p=0.051$ ). Přidáním charakteristiky dárce (věk + příčina úmrtí) jsme zvýšili prediktivní sílu modelu (ROC AUC 0.694, CIV AUC vs. AUC CIV+ věk dárce+ příčina úmrtí  $p= 0.027$ )

## Diskuse

Použití ledvin od dárců s rozšířenými kritérii (ECD) je spojeno s vyšším rizikem opožděného rozvoje funkce štěpu. Řada provedených studií se zaměřila na predikci DGF. Bylo vytvořeno mnoho skórovacích systémů k lepší identifikaci ledvin v riziku. Nicméně, většina skórovacích systémů hodnotila pouze klinickou charakteristiku dárce a příjemce a nezahrnovala histologické hodnocení dárcovského orgánu. Právě histologický nálezy by mohl být užitečný při zhodnocení kvality ledvinného štěpu a k predikci výsledku transplantace. Přesto, v mnoha centrech jsou dárcovské biopsie prováděny pouze za účelem posouzení orgánu od marginálních, tzv. ECD dárců. Kromě toho se ECD klasifikace bez histologického vyšetření často používá jako rozhodovací nástroj pro přijetí či odmítnutí ledvinného štěpu.

Cílem této studie bylo zhodnotit vztah mezi histopatologickým skóre, klinickou charakteristikou dárce a příjemce a rizikem opožděného rozvoje funkce a identifikovat faktory, které by mohly pomoci lépe předpovědět opožděný rozvoj funkce štěpu.

Po zhodnocení velkého množství dárcovských biopsií jsme vytvořili vlastní kompozitní, tzv. CIV skóre, které nezávisle predikovalo DGF. Toto inovativní CIV skóre mělo lepší prediktivní hodnotu než tradiční souhrnné Banffské skóre. Příjemci ledvin s CIV skóre  $\geq 1$ , od dárce staršího 51 let a po anoxickém poškození mozku byli ve vysokém riziku opožděného rozvoje funkce štěpu.

Několik studií prokázalo vztah mezi histopatologickým nálezem a výsledkem transplantace. Nicméně, většina studií zkoumala asociaci se skóre pro jednotlivé kompartmenty ledviny. Pouze jedna studie hodnotila kompozitní skóre, tzv. souhrnné Banffské skóre, které spočívalo v součtu skóre pro intersticiální fibrózu (CI), tubulární atrofii (CT), hyalinní ztluštění arteriol (AH), fibrózní ztluštění intimy (CV) a procentuální zastoupení sklerotizovaných glomerulů (GS) (Snoeijs et al., 2008). Tato konkrétní studie však nezkoumala nezávislost jednotlivých komponentů skóre s výsledkem transplantace. Naše studie je první, která poukázala na to, že jen CI a CV, a ne všechny komponenty souhrnného Banffského skóre jsou nezávislými rizikovými prediktory DGF. Nejen, že jsme prokázali, že kompozitní CIV skóre je při predikci DGF lepší než souhrnné Banffské skóre, ale také umožňuje identifikovat podskupinu ledvin od ECD dárců, které jsou v porovnatelném riziku DGF jako ledviny od SCD dárců. Prediktivní síla kompozitního CIV skóre byla srovnatelná u ECD i SCD dárců.

Přes všechny snahy najít ideální způsob hodnocení kvality orgánu zůstává biopsie dárce spolu s klinickou charakteristikou dárce a příjemce nejlepším prognostickým nástrojem. Anglicheau et al. (Anglicheau et al., 2008) poukázal na to, že kompozitní klinicko-patologické skóre založené na kreatininu dárce, anamnéze hypertenze, % glomerulosklerózy v předimplantačních biopsiích lépe predikovalo osud transplantované ledviny než skórovací systémy založené jen na klinické charakteristice. Naše výsledky podporují roli tradičních rizikových faktorů DGF (např. věk dárce, hladina sérového kreatininu, anoxické poškození mozku dárce), ale zároveň poukazují na význam intersticiální fibrózy (CI) a fibrointimálního ztluštění (CV) v histologickém hodnocení dárcovské ledviny. Kromě toho naše studie zdůrazňuje význam



histologického vyšetření u všech dárcovských ledvin včetně SCD dárců, protože bylo prokázáno, že SCD ledviny s CIV skóre > 1 jsou ve srovnatelném riziku DGF jako ledviny od ECD dárců (40% vs 48%, p = NS). Navíc, skupina ECD ledvin představuje poměrně heterogenní kohortu s různou mírou rizika DGF dle CIV skóre. Výsledky naší studie podporují provádění biopsií dárcovských ledvin u všech bez ohledu na příslušnost dle ECD klasifikace.

### **Závěr**

Inovativní kompozitní histologické CIV skóre spolu s klinickou charakteristikou dárce lépe predikuje riziko DGF než tradiční souhrnné Banffské skóre. Pomocí CIV skóre bylo možné identifikovat ledviny od ECD dárců, které jsou v nízkém riziku DGF. To by mohlo ulehčit alokaci orgánů či výběr imunosupresivního režimu. Použití v klinické praxi je potřebné ověřit na nezávislých kohortách.

**Článek byl publikován v časopise *Transplantation*.**

Identification of Expanded Criteria Donor Kidney Grafts at Lower Risk of Delayed Graft Function. *Transplantation*, 2013, 15;96(7):633-8.

*Kompletní znění článku je přiloženo v anglickém jazyce.*

## Identification of Expanded-Criteria Donor Kidney Grafts at Lower Risk of Delayed Graft Function

Peter Balaz,<sup>1,8</sup> Slavomir Rokosny,<sup>1</sup> Mariana Wohlfahrtova,<sup>2</sup> Peter Wohlfahrt,<sup>3,4,5</sup> Anastazie Bartonova,<sup>6</sup> Eva Pokorna,<sup>7</sup> Eva Honsova,<sup>6</sup> and Ondrej Viklicky<sup>2</sup>

**Background.** Organ shortage leads to the increased use of expanded-criteria donor (ECD) kidneys, which contribute to a higher risk of delayed graft function (DGF) after transplantation. The aim of this study was to determine factors that may better predict the risk of DGF.

**Methods.** Histologic assessments of donor renal biopsy were used with other clinical variables to predict the risk of DGF after kidney transplantation. The total Banff score equaled the sum of interstitial fibrosis (CI), tubular atrophy, arteriolar hyaline thickening, fibrous intimal thickening (CV), and fraction of sclerotized glomeruli.

**Results.** In total, 126 of 344 patients developed DGF after kidney transplantation. The histologic score for CI, tubular atrophy, and CV and the total Banff score were increased in patients with DGF. Only CI and CV were independent predictors of DGF ( $P < 0.01$ ). A CIV score (CI+CV; odds ratio, 2.68; 95% confidence interval, 1.55–4.66;  $P < 0.001$ ) was superior to the combination of the total Banff score (odds ratio, 1.48; 95% confidence interval, 0.85–2.55;  $P = \text{NS}$ ). A CIV score  $\geq 1$ , donor age more than 51 years, and anoxia donor brain injury were associated with the highest risk of DGF. A CIV  $< 1$  identified a subgroup of ECDs at a lower risk of DGF comparable with standard-criteria donors (29.3% vs. 28.4%).

**Conclusions.** Composite CIV score better identifies ECD kidneys with a lower risk of developing DGF. Morphologic evaluation of ECD kidneys and donor characteristics may improve kidney allocation.

**Keywords:** Donor, Biopsy, DGF, Kidney transplantation, ECD.

(*Transplantation* 2013;96: 633–638)

Expanded-criteria donor (ECD) kidneys have been recently used in approximately 50% of kidney transplants to enlarge the donor pool and to allow patients with end-stage renal disease to benefit from transplantation (1). However, the use of ECD kidneys for transplantation is under debate, because they have a greater risk of developing delayed graft function (DGF) or poor graft function and negatively impacting patient survival (2). A robust assessment of organ quality and a full characterization of their

impact on outcome might reduce the number of discarded organs, improve allocation, and improve long-term kidney graft outcomes.

Along with clinical characteristics, donor kidney biopsies remain as the gold standard in many centers (3). Numerous observational studies focused on patients receiving kidney transplantation have evaluated the utility of both clinical scoring systems (4–6) and histopathology-based scoring (7–9) for assessing organ quality and predicting short-term and long-term outcomes before transplantation. Although the 0-hr kidney biopsy is a routine procedure at

Supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for development of research organization 00023001 (IKEM, Prague, Czech Republic) institutional support.

Part of this study was presented at the European Society for Organ Transplantation Congress 2011 in Glasgow, Scotland.

The authors declare no conflicts of interest.

<sup>1</sup> Department of Transplant Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>2</sup> Department of Nephrology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>3</sup> Department of Preventive Cardiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>4</sup> Center for Cardiovascular Prevention of the First Faculty of Medicine Charles University and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic.

<sup>5</sup> International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic.

<sup>6</sup> Clinical and Transplant Pathology Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>7</sup> Transplantcenter, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>8</sup> Address correspondence to: Peter Balaz, M.D., Ph.D., Department of Transplant Surgery, Transplantcenter, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 14821 Prague, Czech Republic. E-mail: peter.balaz@ikem.cz

P.B. contributed to the hypothesis forming, article writing, and data collection. S.R. and E.P. contributed to the data collection. M.W. contributed to the article writing. P.W. contributed to the article writing and data analysis. A.B. and E.H. contributed to the histologic evaluation of samples. O.V. contributed to the results interpretation and article writing.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site ([www.transplantjournal.com](http://www.transplantjournal.com)).

Received 12 March 2013. Revision requested 5 April 2013.

Accepted 24 May 2013.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/13/9607-633

DOI: 10.1097/TP.0b013e31829d9225

some sites, due to methodological variation, they have not been widely accepted as a routine procedure. Also, in some centers, a 0-hr donor biopsy is included in the standard workup, but in the case of ECD kidneys only.

ECD classification (10) represents a rigid tool for how to identify ECDs based on their age, patient history, and cause of death. Clearly, this selection forms a heterogeneous ECD cohort with an unequal risk of DGF. In contrary, many recipients of standard-criteria donor (SCD) kidneys develop DGF despite an uneventful surgery and acceptable length of cold ischemia. Moreover, the interpretation of morphologic findings is often used intuitively and standard guidelines have not been introduced into clinical practice (11).

Thus, the aim of this study was to determine the association between a histopathologic score and clinical variables with the risk for DGF and to identify factors that may better predict the risk of DGF in ECD-positive donors.

## RESULTS

### Donor and Recipient Characteristics

During the study period, 817 patients received single deceased-donor kidney transplantation. In 344 (42.1%) kidneys that were procured in our center, a preimplantation

donor wedge biopsy was performed. The median (range) donor age was 53 (17–76) years, history of hypertension was present in 130 (37.8%) of patients and 30 (8.7%) of donors had diabetes mellitus. The main cause of donor death was stroke (190 [55%] cases). The mean donor serum creatinine was  $95.2 \pm 46.4$   $\mu\text{mol/L}$  and estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to the Modification of Diet in Renal Disease [MDRD] formula was  $1.7 \pm 0.7$   $\text{mL/s/1.73 m}^2$ . In our study, 143 (41.6%) donors were assigned as ECD.

The median (range) recipient age was 55 (20–79) years. The median (range) of dialysis vintage was 696 (428–1072) days and the mean  $\pm$  SD cold ischemic time was  $18.0 \pm 3.7$  hr. Immediate graft function (IGF) was observed in 218 (63.4%) of patients and DGF in 126 (36.6%) of patients. A complete demographic characteristic of donors and recipients is given in Table 1.

### Association of Preimplantation Biopsy with DGF

In the univariate analysis, individuals with IGF and DGF received donor kidneys that differed in interstitial fibrosis (CI), tubular atrophy (CT), and fibrous intimal thickening (CV). Consequently, they also had different total Banff histopathologic scores, which summarize CI, CT, arteriolar hyaline thickening (AH), CV, and fraction of

**TABLE 1.** Donor and recipient demographic data

	Total (n=344)	IGF (n=218)	DGF (n=126)	P <sup>a</sup>
<b>Donor</b>				
Age (range), years	53 (17–76)	52 (17–76)	57 (22–76)	<0.001
Males, n (%)	223 (64.8)	144 (66)	123 (62.7)	NS
Weight, kg	80.75 $\pm$ 16.17	79.14 $\pm$ 14.99	83.54 $\pm$ 17.76	<0.05
History of hypertension, %	130 (37.8)	73 (33.5)	57 (45.2)	<0.05
History of diabetes mellitus, %	30 (8.7)	19 (8.7)	11 (8.75)	NS
Cause of donor death, n (%)				
Stroke	190 (55.2)	124 (56.9)	66 (52.4)	NS
Anoxia	33 (9.6)	11 (5.0)	22 (17.5)	<0.001
Trauma	108 (31.4)	75 (34.4)	33 (26.1)	NS
Other	13 (3.8)	8 (3.7)	5 (4.0)	NS
Maximal serum creatinine, mmol/L	95.22 $\pm$ 46.43	88.6 $\pm$ 35.9	106.6 $\pm$ 58.8	<0.01
eGFR-MDRD, mL/s/1.73 m <sup>2</sup>	1.68 $\pm$ 0.71	1.8 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.7	<0.01
ECD, n (%)	143 (41.6)	74 (33.9)	69 (54.8)	<0.001
<b>Recipient</b>				
Age (range), years	55 (20–79)	54 (23–79)	56 (20–79)	NS
Males, n (%)	233 (67.7)	66.1	70.6	NS
Dialysis vintage, days	696 (428–1072)	631 (388–1010)	806 (515–1338)	<0.01
Cold ischemia time, hr	18.02 $\pm$ 3.73	17.7 $\pm$ 3.95	18.55 $\pm$ 3.28	<0.05
Induction therapy, n (%)				
Rabbit ATG	70 (20)	43 (19.7)	27 (21.4)	NS
Basiliximab	19 (5.5)	9 (4.1)	10 (7.9)	NS
Alemtuzumab	7 (2)	4 (1.8)	3 (2.4)	NS
% Panel-reactive antibodies (range)	4 (0–24)	4 (0–22)	6 (2–24)	NS
Retransplantation, n (%)	56 (16.3)	32 (14.7)	24 (19.0)	NS
Total HLA mismatches	3 (2–4)	3 (3–4)	3 (2–4)	NS

<sup>a</sup>P for comparison of IGF and DGF group.

Data are expressed as median (interquartile range), except for donor and recipient age, which is expressed as median (min–max), mean  $\pm$  SD, or frequency (%) for categorical variables.

ATG, antithymocyte globulin.



**TABLE 2.** Histopathologic evaluation of preimplantation biopsies

	Total (n=344)	IGF (n=218)	DGF (n=126)	P <sup>a</sup>
CI score	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–1)	<0.001
CT score	1 (0–1)	1 (0–1)	1 (1–1)	<0.05
CV score	0 (0–1)	0 (0–1)	1 (0–1)	<0.001
AH score	1 (0–1)	1 (0–1)	1 (0–1)	NS
Glomerulosclerosis (%)	6 (0–16)	5 (0–15)	9 (2–19)	NS
Total Banff score	3 (1.18–4.15)	2.45 (1–3.99)	3.31 (2.06–4.71)	<0.001
CIV score	1 (0–2)	0 (0–1)	1 (1–2)	<0.001

<sup>a</sup>P for comparison of early-onset and DGF group using Mann–Whitney test.

Data are expressed as median (interquartile range). Total Banff score defined as the sum of CI, CT, AH, CV, and GS. CIV score=composite CIV score (CI+CV score).

sclerotized glomeruli (GS). In a generalized linear model with logit link, CI and CV remained independent predictors of DGF ( $P<0.01$  and  $P<0.01$ , respectively), whereas CT was not significant ( $P=0.63$ ). Therefore, for the purpose of this study, the sum of two independent DGF predictors, CI and CV, were combined into a composite variable—CIV score. Histologic evaluation of preimplantation donor biopsy is shown in Table 2 for the whole group and subgroups according to graft function development.

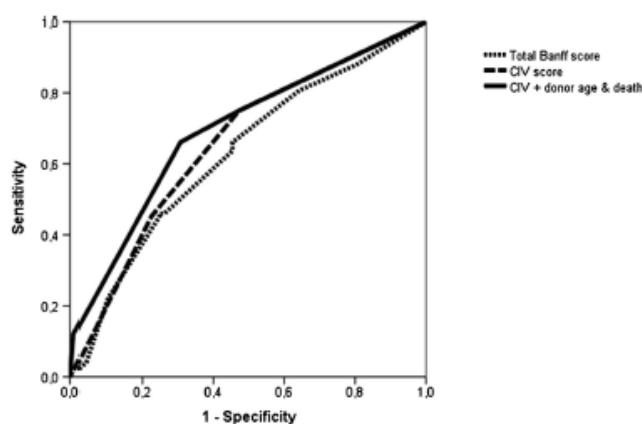
Next, the predictive value of the CIV score and the total Banff score (12) was compared using area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) analysis as described by DeLong et al. (13) and by generalized linear models. There was a borderline difference between the CIV score ROC AUC and the total Banff score ROC AUC ( $P=0.051$ ; Fig. 1), which suggests that the CIV score alone is at least as good of a predictor of DGF as total Banff score. However, by adding the donor characteristics to the model (age+and cause of death), we were able to better predict DGF than using histologic scores alone (CIV AUC vs. CIV+donor age and death, ROC AUC, 0.694;  $P=0.027$ ; Fig. 1).

**Association of Preimplantation Biopsy and Clinical Parameters with DGF**

Due to collinearity between the CIV and total Banff scores, separate generalized linear models were performed. Due to the low sample size in separate subgroups of CIV and Banff scores, and to asses relative risk associated with histologic changes, both the CIV and total Banff scores were dichotomized using ROC curve analysis. New categories were  $CIV<1$  or  $CIV\geq 1$  and total Banff score  $\leq 3$  or Banff score  $\geq 4$ . All clinical parameters that were associated with DGF in univariate analysis were included into the multivariate model with the CIV and total Banff scores.

In the generalized linear model, the CIV score was shown to be an independent predictor of DGF together with donor age, creatinine level, and anoxia injury as the cause of donor brain death (Table 3). In a separate model, total Banff score did not predict DGF, whereas donor age, creatinine level, and anoxia brain injury remained as significant predictors of DGF (Table 4).

Using classification tree analysis, we are able to show that CIV score  $<1$  helped to identify a subgroup of ECD-positive



	AUC (95% CI)		p
Total Banff score	0.626 (0.573 – 0.678)	Total Banff score AUC vs. CIV AUC	0.051
CIV	0.659 (0.606 – 0.710)	Total Banff score AUC vs. CIV + donor age & death AUC	0.002
CIV + donor age & death	0.694 (0.642 – 0.743)	CIV AUC vs. CIV + donor age & death AUC	0.027

**FIGURE 1.** Total Banff score, CIV score, CIV score+donor age, and cause of death ROC curves in DGF prediction. A borderline difference ( $P=0.051$ ) was observed between the CIV and total Banff scores for predicting DGF. By adding the donor characteristics to the model (age+and cause of death), we were able to better predict DGF than using histologic scores alone (CIV AUC vs. CIV+donor age and death, ROC AUC, 0.694;  $P=0.027$ ).

**TABLE 3.** Generalized linear model of DGF predictors including CIV score

	Odds ratio (95% confidence interval)	P
CIV score	2.68 (1.55–4.66)	<0.001
Donor age	1.03 (1.004–1.056)	<0.05
CIT	1.0 (0.99–1.01)	NS
Donor creatinine	1.009 (1.003–1.015)	<0.001
Donor death		
Stroke	1.0	
Anoxia	5.2 (2.16–12.7)	<0.001
Craniotrauma	1.12 (0.63–1.98)	NS
Other	1.56 (0.43–5.58)	NS
HLA DR mismatch	0.72 (0.49–1.05)	0.09
Donor hypertension	1.16 (0.68–1.98)	NS

donors at a lower risk of DGF (see Figure S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/A844>). The DGF risk in ECD-positive donors with CIV<1 was comparable with SCDs (29.3% vs. 28.4%;  $P=NS$ ). This suggests a superiority of the CIV score over the ECD definition itself. The predictive power of the CIV score $\geq$ 1 for DGF prediction did not differ between ECD-positive donors and SCDs (ROC AUC,  $0.63\pm 0.03$  vs.  $0.66\pm 0.03$ ;  $P=NS$ ).

To further validate predictive power of our model (CIV score and donor characteristics), internal validation was performed. We used the split-sample validation of the model. Cases were randomly assigned to training and test samples in 60%:40% ratio. In total, 67.6% of patients in the training sample and 68.9% in the test sample were correctly classified.

## DISCUSSION

The use of ECD kidneys was shown to be associated with a higher risk for DGF (14, 15). A number of studies have focused on the prediction of DGF and several scoring systems were developed to better identify riskier kidney grafts (4, 6, 16). However, most of the scoring systems evaluated only the donor's and recipient's clinical characteristics, without a histologic assessment of the donor kidney (4, 16–19). Morphologic findings might be helpful for further assessment of kidney graft quality and for the prediction of outcome (20–22). However, in many centers, donor biopsies are only performed to assess the organ quality in marginal donors (ECD). Moreover, ECD classification without morphologic assessment is frequently used as a decision-making tool for kidney graft acceptance and allocation strategy. Thus, the aim of this study was to evaluate the association of the histopathologic score and clinical variables with the risk for DGF and to identify factors that may better predict the risk of DGF, especially in ECD-positive donors.

In this study that evaluated a large series of kidney graft biopsies, the composite CIV score independently predicted DGF. Furthermore, composite CIV score, along with clinical variables, had a better predictive value in comparison with the total Banff score and clinical variables. Patients

that received kidney grafts with a CIV score $\geq$ 1 from a donor older than 51 years after anoxia brain death were at a higher risk for DGF development.

A few studies have reported the association of histopathologic findings with the graft outcome, such as CV and CI (21, 23). However, the majority of studies have tested the association of separate histologic changes. There has only been one study that evaluated a composite score (named the “total Banff score”), which consisted of measurements of CI, CT, AH, CV, and the GS (12). However, this particular study did not test the independence of the association of individual score components with graft outcome. Our study is the first showing that not all the components of the total Banff score are independently associated with the risk of DGF. Indeed, we have confirmed that only the CI and CV are independent risk predictors of DGF.

Not only has the composite CIV score been shown to be superior in DGF prediction over total Banff score, but also it allows the identification of a subgroup of ECD-positive kidneys that are at similar risk for DGF as SCDs. Furthermore, the predictive power of the CIV score in DGF prediction did not differ between ECD and SCD.

Despite several attempts (24–26), donor kidney biopsies, together with the clinical donor and recipient characteristics, provide the best tool for assessment of tissue quality and for prognosis (27). Anglicheau et al. (26) showed that a composite clinicopathologic score based on donor creatinine, history of hypertension, and percentage of glomerulosclerosis in preimplantation biopsies was a better predictor of graft outcome than scoring systems using clinical variables alone. Our results support the role of traditional risk factors of DGF (e.g., donor age, serum creatinine level, and anoxia brain death) but point out the significance of CI and fibrointimal thickening in histologic evaluation. Moreover, the importance of a histologic evaluation of all donor kidneys, (including SCDs) is underlined in this study, because SCD kidneys with a CIV score $>$ 1 were shown to be at a similar risk of DGF as ECD kidneys (40% vs. 48%;  $P=NS$ ). Similarly, the ECD group represents a rather heterogeneous cohort with a range of DGF risk, according to the CIV score. Based on the study results, we encourage performing kidney biopsy regardless of ECD classification.

**TABLE 4.** Generalized linear model of DGF predictors including Banff score

	Odds ratio (95% confidence interval)	P
Total Banff score	1.48 (0.85–2.55)	NS
Donor age	1.04 (1.02–1.07)	<0.001
CIT	1.0 (0.99–1.01)	NS
Donor creatinine	1.008 (1.002–1.014)	<0.001
Donor death		
Stroke	1.0	
Anoxia	4.5 (1.9–10.9)	<0.001
Craniotrauma	0.94 (0.52–1.67)	NS
Other	1.24 (0.36–4.34)	NS
HLA DR mismatch	0.73 (0.49–1.07)	NS
Donor hypertension	0.95 (0.55–1.64)	NS



There are some limitations that need to be addressed. Except for retrospective characterization of the study, the mild degree of glomerulosclerosis represents some limitation because donor kidneys with a glomerulosclerosis rate higher than 20% were not accepted for transplantation, as recommended (7, 8). Although a number of studies support such findings (26, 28), others have failed to show a negative association of glomerulosclerosis with DGF (29–31). To eliminate selection bias, it would be of interest to analyze the predictive power of the CIV score in kidneys with glomerulosclerosis above 20%.

In conclusion, this study introduces a composite histologic score, which, along with clinical variables, may better predict the risk of DGF than total Banff score. Moreover, the composite CIV score might help to identify ECD-positive subjects at lower risk for DGF whose organs do not have to be necessarily allocated to older recipients; supposedly, their acceptance would not require use of specific immunosuppressive protocol. Based on results of this study, we suggest preimplantation biopsies to be performed as a routine praxis.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design

In this retrospective single-center cohort study, the outcome of deceased-donor kidney transplantation was assessed in patients who had undergone kidney transplantation between January 2005 and December 2009 and in whom preimplantation wedge kidney donor biopsies were performed (n=344). Kidneys procured outside our center were not included. Living-donor kidney transplantation, dual-kidney transplantation, and patients who lost their graft or died before the first week after transplantation were not considered for further analysis.

### Clinical Variables

The following clinical donor variables were evaluated for each donor before organ procurement: age, gender, weight, history of hypertension, diabetes mellitus, cause of donor death, and last serum creatinine and eGFR-MDRD levels (eGFR using the MDRD formula). Donors older than 60 years or between 50 and 59 years with at least two of three risk factors (death from stroke, preexisting hypertension, or serum creatinine levels higher than 1.5 mg/dL) were assigned as ECDs (10). Kidney graft recipient variables involved age, gender, dialysis vintage, cold ischemia time, antithymocyte globulin, basiliximab or alemtuzumab induction, panel-reactive antibodies and human leukocyte antigen (HLA) mismatches. The presence of DGF was defined as a need of hemodialysis in the first week (32).

### Biopsy and Histologic Assessment

Preimplantation donor wedge renal biopsy was obtained at the time of organ procurement and, after perfusion with Custodiol solution, was processed for routine light microscopy. Tissue was embedded in paraffin, cut in 4- $\mu$ m-thick sections, and stained with hematoxylin-eosin, periodic acid-Schiff, Masson's trichrome, and silver methenamine. Biopsies that contained at least 10 glomeruli and at least one artery were considered to be representative. Biopsies were evaluated according to Banff criteria 2007 (24). Glomerulosclerosis was given as the percentage of global sclerotic glomeruli. The total Banff score was defined as the sum of CI, CT, AH, CV, and GS, as described elsewhere (12).

### Statistics

Data with nonnormal distribution are expressed as the median (interquartile range), the median (min–max) in the case of donor and recipient age, or the mean $\pm$ SD if fulfilling normality criteria or the frequency (percent) of categorical variables. Differences between patients with and without DGF were compared using the Mann–Whitney *U* test for nonnormally distributed continuous variables, the Student's *t* test for normally

distributed continuous variables, or chi-square test for categorical variables. Fisher's exact test was employed when the expected number in a cell for a categorical variable was less than 10.

Histopathologic lesions significantly differing between DGF categories in univariate analysis were afterwards tested in the multivariate model. Due to a nonnormal distribution of variables, we used a generalized linear model with logit link. Classification tree analysis was done using parameters that significantly differed in univariate analysis between graft function onset groups. All analyses were done using SPSS version 19 software (Chicago, IL). A two-sided *P*<0.05 was considered to be statistically significant.

## REFERENCES

1. Womer KL, Kaplan B. Recent developments in kidney transplantation—a critical assessment. *Am J Transplant* 2009; 9: 1265.
2. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, et al. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 968.
3. Mannon RB, Kirk AD. Beyond histology: novel tools to diagnose allograft dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 358.
4. Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ, et al. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2967.
5. Nyberg SL, Matas AJ, Kremers WK, et al. Improved scoring system to assess adult donors for cadaver renal transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 715.
6. Schold JD, Kaplan B, Baliga RS, et al. The broad spectrum of quality in deceased donor kidneys. *Am J Transplant* 2005; 5: 757.
7. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, et al. Glomerulosclerosis as a determinant of posttransplant function of older donor renal allografts. *Transplantation* 1995; 60: 334.
8. Randhawa P. Role of donor kidney biopsies in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 1361.
9. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, et al. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant* 2005; 5: 2464.
10. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, et al. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 114.
11. El-Husseini A, Sabry A, Zahran A, et al. Can donor implantation renal biopsy predict long-term renal allograft outcome? *Am J Nephrol* 2007; 27: 144.
12. Snoeijs MG, Buurman WA, Christiaans MH, et al. Histological assessment of preimplantation biopsies may improve selection of kidneys from old donors after cardiac death. *Am J Transplant* 2008; 8: 1844.
13. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; 44: 837.
14. Delmonico FL, Burdick JF. Maximizing the success of transplantation with kidneys from older donors. *N Engl J Med* 2006; 354: 411.
15. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN Jr, et al. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1039.
16. Nyberg SL, Matas AJ, Rogers M, et al. Donor scoring system for cadaveric renal transplantation. *Am J Transplant* 2001; 1: 162.
17. Moore J, Tan K, Cockwell P, et al. Predicting early renal allograft function using clinical variables. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2669.
18. Nyberg SL, Baskin-Bey ES, Kremers W, et al. Improving the prediction of donor kidney quality: deceased donor score and resistive indices. *Transplantation* 2005; 80: 925.
19. Rao PS, Schaubel DE, Guidinger MK, et al. A comprehensive risk quantification score for deceased donor kidneys: the kidney donor risk index. *Transplantation* 2009; 88: 231.
20. Mengel M, Sis B. An appeal for zero-time biopsies in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 2181.
21. Karpinski J, Lajoie G, Cattran D, et al. Outcome of kidney transplantation from high-risk donors is determined by both structure and function. *Transplantation* 1999; 67: 1162.
22. Randhawa PS, Minervini MI, Lombardero M, et al. Biopsy of marginal donor kidneys: correlation of histologic findings with graft dysfunction. *Transplantation* 2000; 69: 1352.
23. Lopes JA, Moreso F, Riera L, et al. Evaluation of pre-implantation kidney biopsies: comparison of Banff criteria to a morphometric approach. *Kidney Int* 2005; 67: 1595.

24. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713.
25. Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, et al. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med* 2006; 354: 343.
26. Anglicheau D, Loupy A, Lefaucheur C, et al. A simple clinicohistopathological composite scoring system is highly predictive of graft outcomes in marginal donors. *Am J Transplant* 2008; 8: 2325.
27. Mueller TF, Solez K, Mas V. Assessment of kidney organ quality and prediction of outcome at time of transplantation. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 185.
28. Bajwa M, Cho YW, Pham PT, et al. Donor biopsy and kidney transplant outcomes: an analysis using the Organ Procurement and Transplantation Network/United Network for Organ Sharing (OPTN/UNOS) database. *Transplantation* 2007; 84: 1399.
29. Edwards EB, Posner MP, Maluf DG, et al. Reasons for non-use of recovered kidneys: the effect of donor glomerulosclerosis and creatinine clearance on graft survival. *Transplantation* 2004; 77: 1411.
30. Verran D, Sheridan A, Barnwell A, et al. Biopsy of potential cadaveric renal allografts at the time of retrieval. *Nephrology* 2005; 10: 414.
31. Pokorna E, Vitko S, Chadimova M, et al. Proportion of glomerulosclerosis in procurement wedge renal biopsy cannot alone discriminate for acceptance of marginal donors. *Transplantation* 2000; 69: 36.
32. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, et al. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 2995.

### **6.3 Intrarenální exprese genů po indukční léčbě antithymocytárním globulinem a vliv opožděného rozvoje funkce štěpu**

#### **Úvod**

Indukční terapie je spojena s výbornými jednoročními výsledky transplantací ledvin. Cílem této studie bylo vyhodnotit rozdíly v transkripčním profilu vybraných genů v biopsii štěpu ledviny po úspěšné indukční terapii králičím antithymocytárním globulinem (polyklonální depleční protilátkou) a zhodnotit vliv opožděného rozvoje funkce štěpu na rozdíly v expresním profilu.

#### **Metodika**

Pomocí techniky real-time RT-PCR jsme v biopsii štěpu 3 měsíce po transplantaci kvantitativně určili expresi 376 kandidátních genů pro toleranci, zánět, T-a B-buněčnou imunitní odpověď a apoptózu. Zkoumali jsme vzorky z protokolární biopsie ledvin s nerejekčním histologickým nálezem po indukci Thymoglobulinem nebo ATG-Fresenius (ATG-F) a v kontrolní skupině bez indukční léčby.

#### **Výsledky**

Profil exprese genů ve štěpu ledviny po indukci Thymoglobulinem byl odlišný od profilu po indukci ATG-F, rozdíly byly v expresi 18 genů z 376 měřených. Po indukci Thymoglobulinem jsme pozorovali sníženou expresi genů zapojených do dráhy pro NF- $\kappa$ B (TLR4, MyD88, CD209), kostimulaci (CD8, CTLA4), apoptózu (NLRP1), chemotaxi (CCR10) a funkci dendritických buněk (CLEC4C). Při hierarchické klastrové analýze se transkripční profil po indukci Thymoglobulinem zřetelně odlišoval od ATG-F a byl podobný kontrolní skupině (obr. 6).

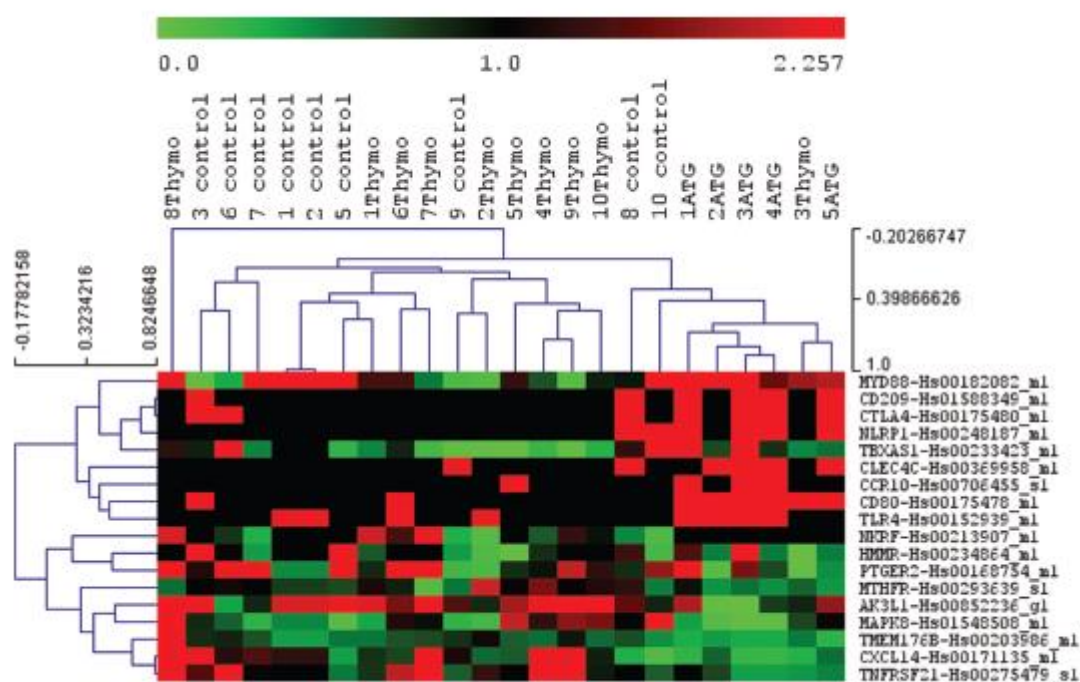
#### **Diskuse**

Předchozí klinické studie poukázaly na rozdíly v účinnosti a bezpečnosti léčby králičími antithymocytárními thymoglobuliny (rATG). V této studii jsme zjistili, že indukce Thymoglobulinem byla spojena s potlačením signální dráhy pro NF- $\kappa$ B, funkci



dendritických buněk, chemoatrakci, apoptózu a kostimulaci, tj. mechanismů, které se účastní jak přirozené, tak adaptivní imunitní odpovědi.

Předpokládá se, že transplantované ledviny s normálním histologickým nálezem a stabilní renální funkcí vykazují heterogenní molekulární fenotyp, což vysvětluje následnou klinickou variabilitu v potransplantačním průběhu. Molekulární heterogenita štěpů je pravděpodobně důsledkem rozdílné imunosuprese.



**Obr. 6. Nekontrovaná hierarchická klastrová analýza použitím 18 rozdílně exprimovaných genů.** Expresní profil po indukci ATG-F se jasně odlišuje od vzorků bez indukce či po indukci Thymoglobulinem. Červená barva označuje zvýšenou expresi, zelená barva sníženou expresi genů (hodnoceno jako relativní kvantita vztažena ke kalibrátoru a tzv. endogennímu housekeeping genu)- podrobnosti viz metody a příložená pdf verze originálního článku).

V naší studii jsme prokázali, že indukční terapie Thymoglobulinem navozuje u imunologicky vysoce rizikových pacientů transkripční profil podobný nízkorizikovým pacientům bez indukční léčby, a že tento profil je odlišný od pacientů léčených ATG-F.

Podobnost genového expresního profilu u pacientů po indukční léčbě Thymoglobulinem a u pacientů bez indukce naznačuje podobnou úroveň aktivace imunitní odpovědi ve štěpu i přes zjevné rozdíly v imunologickém riziku. Toto pozorování posilňuje tvrzení předchozích studií, které ukázaly, že Thymoglobulin je bezpečná a účinná indukční léčba u senzitivovaných pacientů k HLA antigenům k prevenci rejekce po transplantaci ledviny (Eckardt et al., 2009).

V minulosti byl prokázán odlišný imunomodulační potenciál ATG-F a Thymoglobulinu a spekulovalo se o silnějším antirejekčním účinku u Thymoglobulinu (Muller et al., 1999). Segregace ATG-F od skupiny s Thymoglobulinem v nekontrolovaném hierarchickém klastrování naznačuje, že na regulaci alogenní odpovědi po indukci rozdílnými rATG se podílejí různé mechanismy. Ukázali jsme, že u ATG-F dochází i přes aktivaci signální cesty pro NF- $\kappa$ B a genů podílejících se na funkci dendritických buněk ke zvýšení aktivity přirozené imunity, která je dle recentních zjištění součástí akutní rejekce (Obhrai et al., 2006).

Dendritické buňky, nejsilnější antigen prezentující buňky, jsou považovány za potenciaální cíle pro potlačení alloreaktivity a navození tolerance. Bylo prokázáno, že rATG interferují s diferenciací, zráním a imunitní funkcí dendritických buněk a to právě přes aktivaci NF- $\kappa$ B (De Creus et al., 2005). NF- $\kappa$ B reguluje expresi genů zapojených do ischemicko/reperfučního poškození, rejekce štěpu a transplantační tolerance. K aktivaci NF- $\kappa$ B dochází také u akutního poškození ledvin v míře závislé na stupni inflamace (Rangan et al., 1999). Inhibitory a antagonisté aktivace NF- $\kappa$ B měly příznivý efekt v experimentálním modelu poškození ledvin (Sanz et al., 2010). Výše uvedené naznačuje, že aktivace NF- $\kappa$ B hraje kritickou roli při zánětlivém poškození ledviny.

V naší studii jsme prokázali nižší expresi genů pro aktivaci signální dráhy NF- $\kappa$ B v transplantované ledvině po indukční léčbě Thymoglobulinem. Dále jsme pozorovali upregulaci *AK3L1*, potenciaálního tolerančního ukazatele, jehož genové fragmenty byly identifikovány v séru myššího modelu tolerance (Sawitzki et al., 2007). Na rozdíl od jiných pracovních skupin (Feng et al., 2008, Lopez et al., 2006) jsme nenašli rozdíly v genové expresi tolerantního FoxP3. Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováním, které nepotvrdilo zvýšenou upregulaci FoxP3 mRNA transkriptů 2 roky po transplantaci (Louis et al., 2007). Vysvětlením je, že k optimální tvorbě T regs dochází při podstatně

nižší koncentraci rATG než je sérová koncentrace dosažená standardním dávkováním rATG po transplantaci ledviny (AbouZahr et al., 2007).

Ačkoliv je v současnosti použití indukční léčby značně rozšířené, málo se ví, co udržuje tzv. imunitní ticho krátce po transplantaci. Proto jsme se rozhodli analyzovat tříměsíční protokolární biopsie a prozkoumat probíhající molekulární procesy v transplantované ledvině se stabilní renální funkcí, bez anamnézy rejekce a po indukci rATG. Limitací této studie byl nízký počet pacientů a popisný charakter studie. Na straně druhé, jednalo se o první studii, která zkoumala tuto specifickou situaci a poskytla nové informace jak dva různé králičí antithymocytární globuliny kontrolují imunitní odpověď *in vivo*.

Vzhledem k vyšší incidenci opožděného rozvoje funkce štěpu po indukci ATG-F nás zajímalo, jestli pozorovaný rozdíl v transkripčním profilu není důsledkem DGF. Doplnující experiment neprokázal rozdílnou expresi kandidátních genů mezi štěpy s opožděným a okamžitým rozvojem funkce štěpu, což podporuje teorii, že pozorované rozdíly jsou důsledkem rozdílné indukční IS léčby.

## **Závěr**

I přes normální morfologický nález v tříměsíční protokolární biopsii a stabilní renální funkci je intrarenální transkriptom u pacientů léčených různou indukční terapií (Thymoglobulin vs. ATG-F) odlišný. U vysoce rizikových pacientů po indukci Thymoglobulinem byl transkriptom podobný nízkorizikové skupině bez indukce. Domnívame se, že potlačení signální dráhy pro NF- $\kappa$ B po indukci Thymoglobulinem může svědčit pro účinnější alloimunitní regulaci a vysvětlovat úspěch této biologické léčby v klinické praxi.

## **Článek byl publikován v časopise Transplantation.**

Differential regulation of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway by rabbit antithymocyte globulins in kidney transplantation. *Transplantation*. 2012 Mar 27;93(6):589-96.

*Kompletní znění článku je přiloženo v anglickém jazyce.*

## Differential Regulation of the Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathway by Rabbit Antithymocyte Globulins in Kidney Transplantation

Mariana Urbanova,<sup>1,2</sup> Irena Brabcova,<sup>2</sup> Eva Girmanova,<sup>2</sup> Filip Zelezny,<sup>3</sup> and Ondrej Viklicky<sup>1,2,4</sup>

**Background.** Induction therapy is associated with excellent short-term kidney graft outcome. The aim of this study was to evaluate differences in the intra-graft transcriptome after successful induction therapy using two rabbit antithymocyte globulins.

**Methods.** The expression of 376 target genes involved in tolerance, inflammation, T- and B-cell immune response, and apoptosis was evaluated using the quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) method in kidney graft biopsies with normal histological findings and stable renal function, 3 months posttransplantation after induction therapy with Thymoglobulin, ATG-Fresenius S (ATG-F), and a control group without induction therapy.

**Results.** The transcriptional pattern induced by Thymoglobulin differed from ATG-F in 18 differentially expressed genes. Down-regulation of genes involved in the nuclear factor- $\kappa$ B pathway (*TLR4*, *MYD88*, and *CD209*), costimulation (*CD80* and *CTLA4*), apoptosis (*NLRP1*), chemoattraction (*CCR10*), and dendritic cell function (*CLEC4E*) was observed in the biopsies from patients treated with Thymoglobulin. A hierarchical clustering analysis clearly separated the Thymoglobulin group from the ATG-F group, while the control group had a similar profile as the Thymoglobulin group.

**Conclusions.** Despite normal morphology in graft biopsy taken 3 months posttransplantation, the intrarenal transcriptome differed in patients treated with induction therapy using different rATGs. In the Thymoglobulin high-risk group, the transcriptome profile was identical to the low-risk group. Therefore, the down-regulation of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway after Thymoglobulin induction in vivo is likely to explain the clinical success of this biologic.

**Keywords:** Kidney transplantation, Induction, rATG, Tolerance, PCR, Transcriptome.

(*Transplantation* 2012;93: 589–596)

Induction immunosuppression with polyclonal rabbit antithymocyte globulins (rATGs) has been used in kidney transplantation to prevent rejection in patients at higher risk (1). The long-term kidney graft function remains stable after rATG induction in the majority of patients; however, the immunologic mechanisms responsible for these effects are not fully understood. Several immunomodulatory mechanisms of rATG have been proposed, including T-cell depletion (by apoptosis, complement-dependent lysis, or Fc receptor-

mediated antibody-dependent cellular lysis), modulation of cell surface antigens, and leukocyte-endothelium interactions (2–4). The effects of rATG have been studied primarily in T and B cells, although more recent data suggest that dendritic and natural killer cells are relevant targets for the immunosuppressive action of rATGs (5–7). Recently, rATG was shown to induce the expansion and enrichment of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells (Tregs) in vitro, which down-regulate the alloimmune response and have been implicated in tolerance induction in an experimental setting (8, 9). Similarly, Minamimura et al. (10) suggested that rATG may preferentially deplete conventional T cells but spare

This work was supported by grants from Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NS10516-3/2009, NT11227-5/2010, and MZO 00023001, by grant from the Grant Agency of the Czech Republic P301/11/1568, and by grant from the First Charles University in Prague SVV 262 512.

O. V. has received lecture fees from Genzyme and the other authors declare no conflicts of interest.

This work was presented at the XXIII International Congress of the Transplantation Society, Vancouver, Canada, 2010.

<sup>1</sup> Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>2</sup> Transplant Laboratory, Center of Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>3</sup> Department of Cybernetics, Faculty of Electrical Engineering, Czech Technical University, Prague, Czech Republic.

<sup>4</sup> Address correspondence to: Ondrej Viklicky, M.D., Ph.D., Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 14021 Prague, Czech Republic.

E-mail: ondrej.viklicky@ikem.cz

M.U. has participated in the performance of the research, data analysis, and writing the manuscript; I.B. has participated in the performance of the research, data analysis, and contributed new analytic tools; E.G. has participated in the performance of the research; F.Z. has participated in the performance of the gene enrichment analysis; and O.V. has participated in research design and contributed to the writing of manuscript.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site ([www.transplantjournal.com](http://www.transplantjournal.com)).

Received 31 May 2011. Revision requested 22 June 2011.

Accepted 30 November 2011.

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/12/9306-589

DOI: 10.1097/TP.0b013e31824491aa



Tregs. Thymoglobulin and ATG-Presenius S (ATG-F) represent rATGs that are approved for clinical use but differ in the manufacturing process: human thymocytes were used as the immunogen for creating Thymoglobulin, while Jurkat human cells were used to immunize rabbits in the development of ATG-F. Moreover, both rATGs have different immunomodulatory potential that is independent of their capacity to deplete T cells (11–13).

The efficacy of both Thymoglobulin and ATG-F has also been studied in clinical trials. As an induction agent, Thymoglobulin was shown to be superior in the prevention of rejection (14) and improvement of patient survival and graft acceptance (15). Other studies have reported that the efficacy of both biologics was similar (16, 17), although some differences in the observed side effects have been reported (14–18).

To date, little is known about the effects of rATG induction on the transcriptome of renal allografts. We hypothesized that Thymoglobulin and ATG induce unique transcriptome profiles, including genes involved in the maintenance of transplantation tolerance, when used as inductive agents in immunologically high-risk patients who had not experienced rejection and had normal kidney graft function 3 months postinduction. To investigate this possibility, we quantified the intragraft messenger RNA (mRNA) expression of 376 genes involved in tolerance, inflammation, T- and B-cell immune response, and apoptosis in 3 months protocol biopsy in patients who received induction immunosuppression with Thymoglobulin or ATG-F.

## RESULTS

### Patients' Demographic Data

Twenty-four patients were enrolled in the study. The demographics and distribution of clinical variables are summarized in Table 1. Nine low-risk patients did not receive induction therapy (control group), 10 high-risk patients received induction immunosuppression with Thymoglobulin, and an additional 5 patients received induction with ATG-F. Delayed graft function (DGF), which was defined as the requirement for dialysis within the first week after transplantation, developed in 3 of 5 grafts in the ATG-F group, 1 of 10 grafts in the Thymoglobulin group, and 1 of 9 grafts in the control group ( $P < 0.05$ ). Despite these differences in graft function development, the renal function did not differ among the studied groups at the time of biopsy.

### Clinical Follow-Up

The patients were followed for 2 years after transplantation, and no decrease in function, graft loss, or patient death was observed in either group (Table 1). One patient from the control group experienced a subsequent episode of clinical acute T-cell-mediated rejection at day 186 after transplantation because of noncompliance but was successfully treated with methylprednisolone.

### T-Cell Depletion

T-cell depletion was effectively sustained in both studied groups, although absolute T-cell (CD3+) counts on day 6 were significantly lower in the Thymoglobulin group than the ATG-F group ( $9 \pm 6.2$  vs.  $16.4 \pm 6.42$  cells/ $\mu$ L, respectively;  $P < 0.01$ ). However, the clinical relevance of this difference was negligible.

### Transcriptional Analysis Distinguishes ATG-F Grafts From Thymoglobulin Grafts

Twenty-four renal biopsy samples were analyzed and the relative expression levels of 376 candidate genes were measured and normalized using the housekeeping gene *glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH)*. Despite stable renal function and identical histology with normal findings from protocol biopsies of patients in all three groups, the transcriptional pattern of the biopsies was markedly different in the ATG-F group compared with the Thymoglobulin and control groups. A comparison of mRNA expression profiles of the ATG-F group with the Thymoglobulin group identified 18 genes that were differentially expressed (Table 2; Fig. 1).

The most significant finding was the differential expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-associated genes, which suggested higher activity of this pathway in the ATG-F group. Specifically, the gene expressions of *Toll-like receptor 4 (TLR4)*, *transmembrane receptor of dendritic cells (CD209)*, which is an initiator of innate immunity through modulation of TLR, and *myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88)*, which is an adapter protein used by TLRs to activate NF- $\kappa$ B, were all increased in the ATG-F group. The ATG-F group showed a significant decrease in *NF- $\kappa$ B repressing factor (NKRF)* expression, which is a mediator of transcriptional repression of certain NF- $\kappa$ B-responsive genes, *prostaglandin E receptor 3 (PTGER3)*, which is a suppressor of proinflammatory factor production through inhibition of NF- $\kappa$ B activity (19), *mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8)*, which is required for TNF- $\alpha$  induced apoptosis, and *TNF-receptor superfamily 21 (TNFRSF21)*, which is an activator of NF- $\kappa$ B. The observed upregulation of the NF- $\kappa$ B pathway was validated by an enrichment analysis ( $P < 0.05$ ).

ATG-F induction also resulted in the upregulation of *hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)* and *thromboxan A synthase 1 (TBXAS1)* and genes involved in dendritic cell function (*CLEC4E*), costimulation (*CD80* and *CTLA4*), apoptosis (*NLRP1*), and chemoattraction (*CCR10*) compared with Thymoglobulin. In contrast, Thymoglobulin induced the upregulation of *adenylate kinase 3-like 1 (AK3L1)*, which is a novel immune tolerance marker (20), *CXCL14*, which is a chemotactic factor for immature dendritic cells, *TMEM176B*, which is a factor that suppresses the maturation of dendritic cells, and *MTHFR*. In regards to the described tolerogenic potential of rATG in vitro, we only detected *FoxP3* transcripts in a few biopsies, and *FoxP3* mRNA expression did not differ between the studied groups (data not shown).

### Hierarchical Clustering

Transcriptome analysis confirmed that the transcripts in the Thymoglobulin group were distinct from the ATG-F group. Supervised hierarchical clustering analysis revealed that the main split in the dendrogram clearly distinguished the ATG-F group from the Thymoglobulin group. Moreover, gene expression profiles in the control group were similar to the Thymoglobulin group (see Figure, SDC 1, <http://links.lww.com/TP/A595>). Unsupervised hierarchical clustering analysis using 18 differentially expressed genes from a univariate analysis demonstrated a different gene expression pattern for ATG-F samples based on clear separation from the other samples (Fig. 2).

**TABLE 1.** Patient's demographics and clinical characteristics

	Control (n=9)	Thymoglobulin (n=10)	ATG-Fresenius (n=5)	P
<b>Recipient</b>				
Age (yr)	44.9±13.15	57±9.94	53.6±17.15	NS
Sex (% male)	55	80	60	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.90±3.95	25.60±4.16	25.68±3.5	NS
PRA (%)	6.67±10.2	71.10±16.9	67.20±14.87	<0.001
Donor age (yr)	41.56±12.27	51.3±15.84	46.43±12.88	NS
Total HLA mismatch	4.00±0.87	3.80±1.23	2.80±0.84	NS
Cold ischemia time (hr)	17.64±2.9	18.77±2.68	18.28±3.31	NS
ECD donor	1/9 (11.1%)	6/10 (60%)	1/5 (25%)	<0.05
Delayed graft function <sup>a</sup>	1/9 (11%)	1/10 (10%)	3/5 (60%)	<0.01
<b>Serum creatinine (μmol/L)</b>				
mo 3	111.8±28.9	127.4±41.26	117.6±15.69	NS
yr 1	111.63±34.23	130.06±46.54	103.40±21.1	NS
yr 2	149.38±129.65	140.03±68.58	102.24±19.79	NS
Δ Cr (yr 1—mo 3)	-1.29±36.6	2.66±11.76	-14.20±12.11	NS
Δ Cr (yr 2—mo 3)	37.6±130.49	12.63±31.54	-15.36±11.51	NS
<b>GFR estimated with MDRD (mL/sec)<sup>b</sup></b>				
mo 3	1.06±0.23	0.94±0.29	0.98±0.26	NS
yr 1	1.10±0.35	0.96±0.19	1.11±0.21	NS
yr 2	0.91±0.41	0.86±0.32	1.03±0.21	NS
Δ MDRD (yr 1—mo 3)	0.07±0.23	-0.04±0.34	0.13±0.38	NS
Δ MDRD (yr 2—mo 3)	-0.15±0.41	-0.03±0.2	0.05±0.29	NS
<b>Proteinuria (g/d)</b>				
mo 3	0.12±0.1	0.21±0.12	0.19±0.14	NS
yr 1	0.04±0.25	0.18±0.15	0.20±0.20	NS
yr 2	0.16±0.13	0.27±0.29	0.08±0.09	NS
Δ proteinuria (yr 1—mo 3)	-0.08±0.11	0.03±0.18	0.02±0.18	NS
Δ proteinuria (yr 2—mo 3)	0.05±0.19	0.06±0.33	-0.1±0.18	NS
Patients with acute rejection (mo 3–12)	1	0	0	NS
Protocol biopsy (d after Tx)	99±9.06	95±5.03	98±8.73	NS

Data are expressed as mean±SD (SD) or n (%).

<sup>a</sup> Delayed graft function was defined as a need for dialysis within the first week after transplantation.

<sup>b</sup> MDRD formula:  $(170 \times [\text{SCr}]^{-0.999} \times [\text{Age}]^{-0.176} \times [0.762 \text{ if patient is female}] \times [1.18 \text{ if patient is black}] \times [\text{BUN}]^{-0.170} \times [\text{Alb}]^{0.318}$ .

BMI, body mass index; PRA, panel reactive antibody; HLA, human leukocyte antigen; ECD, extended criteria donor; GFR, glomerular filtration rate; MDRD, modification of diet in renal disease; Tx, transplantation; NS, not significant.

### The Observed Difference Between Two rATG Agents Is Not a Consequence of DGF

To determine whether the different gene expression profiles were related to DGF, an additive experiment was performed. In total, 33 renal allografts were included in the additive study, including 19 grafts with primary graft function and 14 grafts with DGF. The patient demographics and clinical characteristics are shown in Supplemental Table 1 (see **Table, SDC 2**, <http://links.lww.com/TP/A596>). The additive experiment did not show a statistically significant difference in the expression of the investigated genes between grafts with and without DGF (Table 3). These data provided additional evidence that the differences observed in our study were not the consequence of DGF but were due to the different rATGs used.

### DISCUSSION

Differences in the efficacy and safety profile between rATGs have been observed in previous clinical trials. In this study, we showed that Thymoglobulin induction was associated with down-regulation of NF-κB signaling, dendritic cell function, chemoattraction, apoptosis, and costimulation in rejection-free grafts from patients with normal histology and stable function compared with ATG-F. We found that the transcriptome of patients treated with these two regimens differed in a cluster of genes associated with the NF-κB pathway and dendritic cell activity, which are involved in innate and adaptive immunity, respectively.

It is possible that kidney transplant recipients with normal histological findings in protocol biopsy may differ in



**TABLE 2.** Target genes differentially expressed in biopsies from patients treated with Thymoglobulin vs. ATG-Fresenius

Target gene	Thymoglobulin	ATG-F	P <sup>a</sup>
<i>AK3L1</i>	2.54 (1.65–6.38)	0.757 (0.01–1.72)	<0.05
<i>CCR10</i>	0 (0–0)	8.711 (0–54.04)	<0.05
<i>CD209</i>	0 (0–0)	17.86 (15.52–101.0)	<0.01
<i>CD80</i>	0 (0–0)	65.658 (51.73–71.71)	<0.05
<i>CLEC4C</i>	0 (0–0)	12.91 (3.21–136.27)	<0.05
<i>CTLA4</i>	0 (0–0)	108.376 (93.04–149.89)	<0.001
<i>CXCL14</i>	0.85 (0.67–3.67)	0.237 (0.23–0.57)	<0.05
<i>HMMR</i>	0.0055 (0–0.09)	0.529 (0.51–1.41)	<0.05
<i>MAPK8</i>	1.22 (0.79–1.69)	0.082 (0.04–0.38)	<0.05
<i>MTHFR</i>	1.06 (0.68–1.18)	0.443 (0.43–0.55)	<0.05
<i>MYD88</i>	1.09 (0.56–1.39)	2.257 (1.89–6.7)	<0.05
<i>NKRF</i>	1.29 (0.95–2.01)	0 (0–0)	<0.001
<i>NLRP1</i>	0 (0–0)	10.71 (8.93–41.96)	<0.01
<i>PTGER2</i>	1.1 (1.03–5.5)	0.438 (0.44–0.74)	<0.05
<i>TBXAS1</i>	0.14 (0.06–0.47)	0.797 (0.72–2.93)	<0.05
<i>TLR4</i>	0 (0–0)	160.875 (151.33–185.1)	<0.05
<i>TMEM176B</i>	0.65 (0.57–0.86)	0.33 (0.32–0.34)	<0.01
<i>TNFRSF21</i>	1.63 (0.92–4.84)	0.496 (0.38–0.72)	<0.05

Data are expressed as gene expression levels RQ [median (interquartile range)] normalized to *glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase*.

<sup>a</sup> According to the Mann-Whitney *U* test with adjustment for multiple comparisons.

their molecular phenotype, which could ultimately determine the clinical variability observed posttransplantation. The ongoing allogeneic immune response, which was only manifested by distinct molecular changes and the absence of morphological and functional alterations, may explain the different posttransplant outcomes in patients with identical histological findings. Therefore, it is hypothesized that the molecular heterogeneity of such biopsies is a consequence of the different immunosuppressants used.

In our study, induction therapy with Thymoglobulin in high-risk patients was shown to induce an identical transcriptome profile as low-risk subjects who had not received induction therapy but differed from patients treated with ATG-F. The homogeneity of the gene expression profile from patients in the Thymoglobulin and control groups suggests a similar level of immune response to the graft despite the apparent difference in immunologic risk. These observations strengthen previous studies showing that Thymoglobulin induction is a safe and efficient therapy for sensitized patients to prevent rejection after kidney transplantation. Importantly, this therapy option is recommended by Kidney Disease: Improving Global Outcomes guidelines (1, 21, 22).

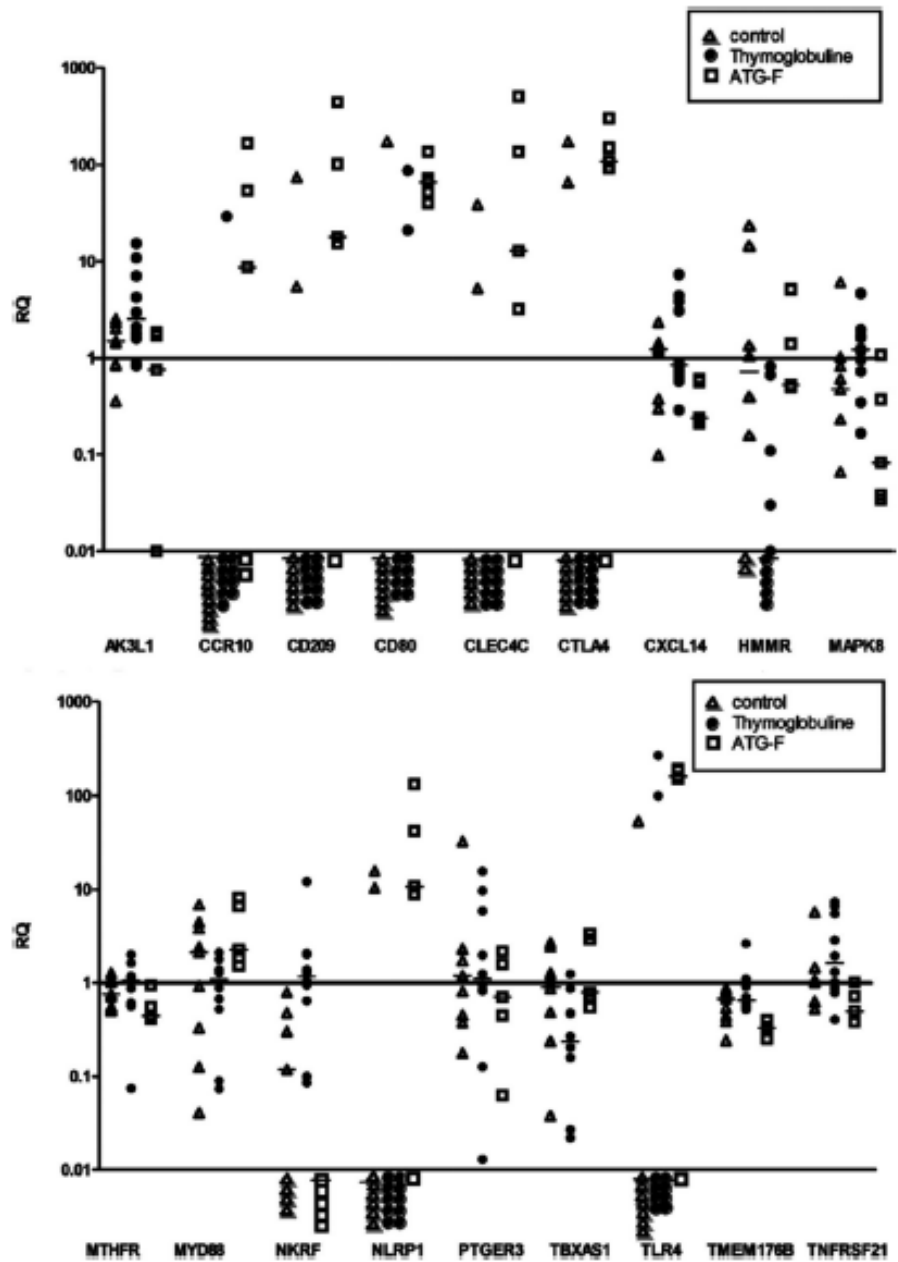
Thymoglobulin and ATG-F were previously shown to have different immunomodulatory potential, and Thymoglobulin was hypothesized to have stronger antirejection effects (11–13). The segregation of ATG-F from the Thymoglobulin pattern in unsupervised hierarchical clustering suggests that different mechanisms are involved in the regulation of an allogeneic response. Here, we show that the differences

in gene expression patterns predominantly involved the upregulation of the innate immune system through activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway and genes involved in dendritic cell function, which were observed in the ATG-F group. Recently, increasing evidence has supported a role for the innate immune system in acute allograft rejection (23). Dendritic cells, the most potent antigen-presenting cells of the innate immune system, are regarded as potential targets for suppressing alloreactivity and induction of allograft tolerance. In addition, it has been reported that rATGs interfere with DC differentiation, maturation, and immune function through NF- $\kappa$ B activation (24).

NF- $\kappa$ B regulates the expression of genes involved in ischemic-reperfusion injury, graft rejection, and transplant tolerance. NF- $\kappa$ B is also activated in acute kidney injury, and its activation correlates with the severity of inflammation (25). Moreover, inhibitors and antagonists of NF- $\kappa$ B activation have been shown to have a beneficial effect in an experimental model of kidney injury (26, 27). Together, these findings suggest that NF- $\kappa$ B activation plays a critical role in renal inflammation.

In this study, we showed that the expression level of genes involved in activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway was lower in renal allografts after induction treatment with Thymoglobulin compared with rATG. We also observed the upregulation of *AK3L1* in Thymoglobulin allografts, which seems to be a potential novel tolerance marker, as fragments of this gene were identified in the serum of a rat model of acceptance (20). In contrast to Lopez et al. and Feng et al., who found an expansion of CD4+CD25+FoxP3+ Tregs in vitro (8, 9), we did not find differences in *FoxP3* gene expression after rATG induction, which is a defining functional marker of this cell type. These results are in agreement with the observation by others showing that *FoxP3* mRNA transcripts were not upregulated 2 years posttransplantation (28). Moreover, the optimal concentration of rATG for the in vitro generation of Tregs seems to be markedly lower than the serum concentration achieved after treatment with standard rATG doses (29).

Although inductive agents are excessively used in kidney transplantation, little is known about how these drugs maintain silencing of the immune system during the initial posttransplant period. Therefore, we chose to analyze biopsies 3 months posttransplantation to explore ongoing molecular processes in stable kidney allografts after different induction treatments were administered, in patients who had not showed previous rejections. To the best of our knowledge, this study is the first attempt aimed at analyzing this specific clinical setting. Although the study was limited by the sample size and descriptive nature, these findings provide new information on how the different rATGs control the immune response in vivo. In conclusion, we have demonstrated that Thymoglobulin and ATG-F induction induce a different intrarenal transcript profile in patients 3 months posttransplantation despite normal morphology and stable kidney graft function. Moreover, induction therapy with Thymoglobulin in high-risk patients was shown to induce an identical transcriptome profile in low-risk subjects who had not received induction therapy. The differential gene expression, which resulted in lower activity of NF- $\kappa$ B-dependent pathways, seems to favor better alloimmune regulation in Thymoglobulin induction.



**FIGURE 1.** Transcript level differences in biopsies of renal allografts from patients treated with Thymoglobuline vs. ATG-F. The relative transcript prevalence for each patient biopsy sample is shown in transcripts with significantly differential expressions when comparing Thymoglobuline and ATG-F group. Individual, log-scale, quantitative fold levels of RNA transcripts are shown for the control group (triangles), Thymoglobuline group (full circles), and ATG-F group (ATG, squares) biopsies referenced to the calibrator sample biopsy. Symbols located below the graph baseline indicate undetectable levels. Red bars represent the median fold level of RNA transcripts for each biopsy group.

**MATERIALS AND METHODS**

**Study Design**

To analyze the tolerance potential of rATGs, we first identified all patients receiving induction immunosuppression with Thymoglobulin or ATG-F treatment who had normal histology in protocol biopsy, stable kidney graft function without proteinuria or infection, and no rejection history. Protocol renal biopsies were performed at the third month posttransplantation during 2005 to 2008. Rigorous sample selection was based on normal morphologic findings according to the Banff 2005 classification and absence of acute tubular necrosis, interstitial fibrosis and tubular atrophy, and inflammatory infiltrate. All patients treated with rATGs had panel reactivity antibody more than 50% and were considered to be at high risk for rejection. The control group consisted of patients considered to be at low risk for rejection (panel reactivity antibody < 20%; first kidney transplantation) and received cal-

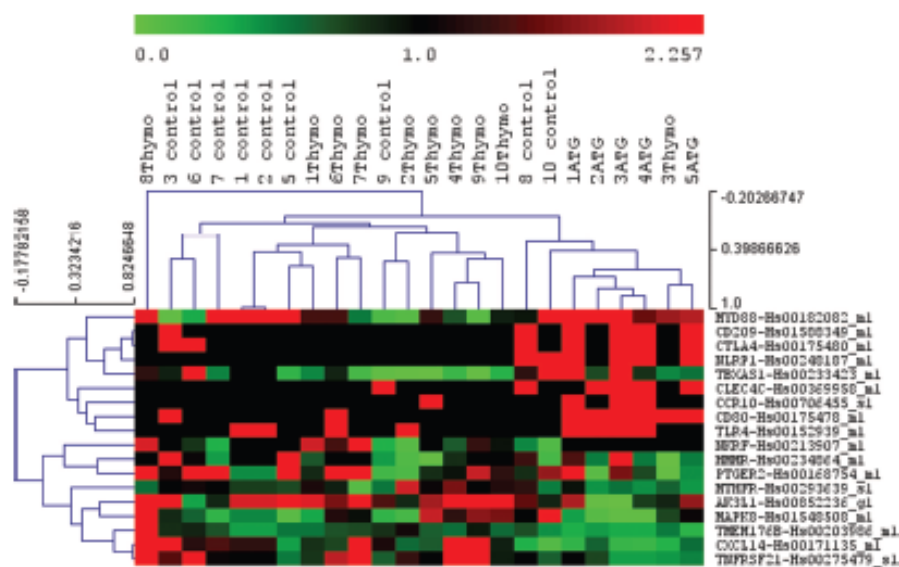
cineurin inhibitor-based immunosuppressants with mycophenolate mofetil (MMF) and steroids. All patients were monitored for 24 months. The Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine approved the study protocol and all patients signed informed consent to participate in the study (Institutional Review Board approval number G08-08-10).

**Therapy**

Recipients at high risk of rejection received induction therapy with Thymoglobulin (Thymoglobulin, Genzyme Corporation, Cambridge, MA) or ATG-F (Presentus AG, Bad Homburg, Germany) according to our center practice at certain time periods (ATG-F: 10/2005–03/2007; Thymoglobulin 03/2007 to present). The rATG therapies were initiated intraoperatively and followed daily until the sixth postoperative day according to the manufacturer’s recommendation. In case of side effects, the rATG doses were re-



**FIGURE 2.** Unsupervised hierarchical clustering analysis using 18 differentially expressed genes. Unsupervised hierarchical clustering analysis demonstrated a different gene expression pattern for ATG-F samples by their clear separation from the others.



**TABLE 3.** Expression profiles of target genes from patients with delayed graft function vs. primary function

Target gene	PGF (n=19)	DGF (n=14)	Uncorrected P value*
AK3L1	0.504 (0.375–0.599)	0.527 (0.3693–0.6318)	NS
CCR10	1.333 (0.000–3.068)	1.5045 (0.000–13.3125)	NS
CD209	0.119 (0.074–0.282)	0.1815 (0.082–0.3708)	NS
CD80	0.14 (0.000–1.279)	0.668 (0.0225–1.911)	NS
CLEC4C	10.985 (0.000–26.815)	12.16 (0.9113–42.3823)	NS
CTLA4	0.152 (0.0001–0.409)	0.3455 (0.2188–1.9870)	NS
CXCL14	28.665 (17.654–35.398)	28.874 (20.7965–47.6458)	NS
HMMR	0.642 (0.245–1.157)	0.6475 (0.2105–1.021)	NS
MAPK8	0.086 (0.064–0.113)	0.071 (0.0615–0.089)	NS
MTHFR	3.33 (2.635–3.925)	3.195 (2.4285–3.8585)	NS
MYD88	0.365 (0.255–0.606)	0.523 (0.318–0.6163)	NS
NKRF	0.264 (0.173–0.375)	0.279 (0.2003–0.3473)	NS
NLRP1	0.648 (0.330–0.972)	0.76 (0.444–0.8993)	NS
PTGER2	1.737 (0.906–3.372)	1.539 (1.1895–2.9113)	NS
TBXAS1	0.296 (0.206–0.599)	0.4175 (0.2753–0.69)	NS
TLR4	0.087 (0.033–0.160)	0.0825 (0.023–0.202)	NS
TMEM176B	2.429 (2.176–2.873)	2.56 (2.1873–2.975)	NS
TNFRSF21	7.634 (6.37–8.456)	7.1235 (5.8953–8.6318)	NS

Data are expressed as gene expression levels RQ [median (interquartile range)] normalized to *glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase*. Delayed graft function is defined as a need for dialysis within the first week after transplantation.

\* According to the Mann-Whitney U test.

NS, not significant.

duced. The final cumulative doses of Thymoglobulin and ATG were  $6.03 \pm 0.89$  and  $11.82 \pm 1.29$  mg/kg, respectively. The efficacy of rATGs for depleting peripheral T cells was evaluated by determining the absolute CD3+ counts in peripheral blood on day 6. It is accepted that CD3+ T-cell counts below 50 cells/ $\mu$ L represent profound and adequate depletion (30). All patients received maintenance immunosuppressant therapy with Tacrolimus (Prograf; Astellas Pharma, Inc., Deerfield, IL), MMF (Cellcept; Roche Laboratories, Nutley, NJ), and prednisone.

### Protocol Biopsy

Protocol kidney graft biopsy was performed in accordance with our center practice 3 months posttransplantation. Histological examination was inter-

preted according to the 2005 Banff working classification criteria. A small portion (2 mm) of the cortical zone of the biopsy specimen was immediately placed in the RNA later Stabilization Reagent (QIAGEN) and stored at  $-20$  or  $-80^\circ\text{C}$  for RNA extraction.

### RNA Extraction and Complementary DNA Synthesis

Renal tissue was homogenized and total RNA was isolated using RNA blue reagent (Top-Bio s.r.o., Czech Republic) according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in 30  $\mu$ L of RNase-free water. The purity and concentration of the RNA were assessed on an ultraviolet-visible spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). The RNA isolation method

routinely used in our laboratory was validated and standardized on reference samples, thereby eliminating errors and ensuring the same standard across all measurements. The quality of RNA samples obtained by standard isolation protocol was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). An RNA integrity number of 8 to 10 indicated high-quality RNA that was suitable for further analysis. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . A total amount of 2  $\mu\text{g}$  RNA was used for complementary DNA synthesis using Superscript Reverse Transcriptase (Nitrogen, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA was treated with DNase, and only complementary DNA samples without genomic DNA contamination were used for TaqMan low-density array (TLDA) analysis.

### Real-Time RT-PCR Analysis Using TLDA

Gene expression profiling was performed using a custom-made TLDA to analyze 376 candidate genes known to have implications in the immune response (chemokine defense, apoptosis, inflammation, tolerance, and TGF $\beta$  signaling [see Table, SDC 3, <http://links.lww.com/TP/A597>]). A quantitative real-time Reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay based on TLDA technology was performed as previously described (31) and data were quantified using the SDS 2.4 software package (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### Expression Data Analysis

Relative gene expression values were generated from TLDA analysis using the comparative  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method for relative quantification (RQ) (32), which is implemented in the Applied Biosystems RQ Manager Software v1.2.1 (Applied Biosystems). To calculate the RQ of target genes in transplanted kidney after induction with Thymoglobulin compared with ATG, one sample from the control group was designated as the calibrator. Using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , the data are presented as the fold change in gene expression normalized to an endogenous reference gene and relative to the no induction control.

### Additive Experiment

To exclude the effect of DGF on the study results, we additionally evaluated the expression patterns of genes that significantly differed between the Thymoglobulin and ATG-F groups in biopsies obtained from patients 3 months posttransplantation who had experienced DGF or primary graft function. Grafts experiencing DGF due to surgical complications or rejection episodes were not included. All patients received an immunosuppressive regimen consisting of Tacrolimus, MMF, and steroids without induction treatment.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS v.17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) and GraphPad InStat v. 3.05 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). A Student's  $t$  test and the analysis of variance were applied to the variables following a normal distribution. Based on the distribution of the gene expression data, we performed nonparametric testing and data were expressed as median and interquartile ranges. The significance of differential gene expression among the control, Thymoglobulin, and ATG-F groups was determined using Kruskal-Wallis test. Post hoc intergroup comparisons were made using the Mann-Whitney test with adjustment for multiple comparisons. Significance was defined as a two-sided  $P$  value less than 0.05. Unsupervised hierarchical clustering that grouped together genes with similar expression patterns was performed with StatMiner 3.0.0 Software (Integromix, Madrid, Spain) and MultiExperiment Viewer 4.6.0 (TM4, Boston, MA). The putative enrichment of the NF- $\kappa$ B pathway was performed using the Global test method as previously described (33, 34).

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the transplantation coordinators, nurses, and patients for their cooperation and help. Special thanks to Jiri Belohradsky for his help with the gene enrichment analysis, Romana Polackova for expert technical assistance, and Vera Dankova for her help with data collection.

### REFERENCES

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9 (suppl 3): S1.
2. Preville X, Flacher M, LeMauff B, et al. Mechanisms involved in anti-thymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation* 2001; 71: 460.
3. Michallet MC, Preville X, Flacher M, et al. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation* 2003; 75: 657.
4. Beiras-Fernandez A, Chappell D, Hammer C, et al. Impact of polyclonal anti-thymocyte globulins on the expression of adhesion and inflammation molecules after ischemia-reperfusion injury. *Transpl Immunol* 2009; 20: 224.
5. Daniel V, Naujokat C, Sadeghi M, et al. Association of IL-12 + DC with high CD3 + CD4-DR + lymphocyte counts in long-term HIV-infected hemophilia patients with clinically stable disease. *J Clin Immunol* 2008; 28: 58.
6. Dalle JH, Dardari R, Menezes J, et al. Binding of thymoglobulin to natural killer cells leads to cell activation and interferon-gamma production. *Transplantation* 2009; 87: 473.
7. Naujokat C, Berges C, Fuchs D, et al. Antithymocyte globulins suppress dendritic cell function by multiple mechanisms. *Transplantation* 2007; 83: 485.
8. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, et al. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: Induction of CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2844.
9. Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, et al. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4 + CD25highFOXP3 + regulatory T cells in vitro. *Blood* 2008; 111: 3675.
10. Minamimura K, Gao W, Maki T. CD4 + regulatory T cells are spared from deletion by antilymphocyte serum, a polyclonal anti-T cell antibody. *J Immunol* 2006; 176: 4125.
11. Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, et al. A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 1994; 57: 685.
12. Bourdage JS, Hamlin DM. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation* 1995; 59: 1194.
13. Müller TF. Long-term T cell dynamics following the use of polyclonal and monoclonal antibodies. *Graft* 1999; 2.1 (suppl): 15.
14. Zuckermann AO, Grimm M, Czerny M, et al. Improved long-term results with thymoglobuline induction therapy after cardiac transplantation: A comparison of two different rabbit-antithymocyte globulins. *Transplantation* 2000; 69: 1890.
15. Opelz G, Naujokat C, Daniel V, et al. Disassociation between risk of graft loss and risk of non-Hodgkin lymphoma with induction agents in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 81: 1227.
16. Schnetzler B, Leger P, Volp A, et al. A prospective randomized controlled study on the efficacy and tolerance of two antilymphocytic globulins in the prevention of rejection in first-heart transplant recipients. *Transpl Int* 2002; 15: 317.
17. Krogsgaard K, Boesgaard S, Aldershvile J, et al. Cytomegalovirus infection rate among heart transplant patients in relation to the potency of antithymocyte immunoglobulin induction therapy. Copenhagen Heart Transplant Group. *Transplant Proc* 1994; 26: 1718.
18. Ducloux D, Kazory A, Challier B, et al. Long-term toxicity of antithymocyte globulin induction may vary with choice of agent: A single-center retrospective study. *Transplantation* 2004; 77: 1029.
19. Ogawa M, Suzuki J, Kosuge H, et al. The mechanism of anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 receptor 4 activation in murine cardiac transplantation. *Transplantation* 2009; 87: 1645.
20. Sawitzki B, Bushell A, Steger U, et al. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant* 2007; 7: 1091.
21. Thibaudin D, Alamartine E, de Filippis JP, et al. Advantage of antithymocyte globulin induction in sensitized kidney recipients: A randomized prospective study comparing induction with and without antithymocyte globulin. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 711.
22. Charpentier B, Rostaing L, Berthoux F, et al. A three-arm study comparing immediate tacrolimus therapy with antithymocyte globulin induction therapy followed by tacrolimus or cyclosporine A in adult renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 75: 844.

23. Obhrai J, Goldstein DR. The role of toll-like receptors in solid organ transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 497.
24. De Creus A, Abe M, Lau AH, et al. Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin. *J Immunol* 2005; 174: 2037.
25. Rangan GK, Wang Y, Tay YC, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats. *Kidney Int* 1999; 56: 118.
26. Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, et al. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1254.
27. Hutchings A, Wu J, Asiedu C, et al. The immune decision toward allograft tolerance in non-human primates requires early inhibition of innate immunity and induction of immune regulation. *Transpl Immunol* 2003; 11: 335.
28. Louis S, Audrain M, Cantarovich D, et al. Long-term cell monitoring of kidney recipients after an antilymphocyte globulin induction with and without steroids. *Transplantation* 2007; 83: 712.
29. AbouZahr C, Cleland J, Coullare F, et al. The way forward. *Lancet* 2007; 370: 1791.
30. Midtvedt K, Fauchald P, Lien B, et al. Individualized T cell monitored administration of ATG versus OKT3 in steroid-resistant kidney graft rejection. *Clin Transplant* 2003; 17: 69.
31. Sanchez-Espiridion B, Sanchez-Aguilera A, Montalban C, et al. A TaqMan low-density array to predict outcome in advanced Hodgkin's lymphoma using paraffin-embedded samples. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1367.
32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> method. *Methods* 2001; 25: 402.
33. Goeman JJ, van de Geer SA, van Houwelingen HC. Testing against a high dimensional alternative. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol* 2006; 68: 477.
34. Goeman JJ, Buhlmann P. Analyzing gene expression data in terms of gene sets: methodological issues. *Bioinformatics* 2007; 23: 980.

## **6.4 Predikce akutní rejekce po transplantaci ledviny vyšetřením exprese tolerantních genů v periferní krvi**

### **Úvod**

Nedávno byl identifikován molekulární profil pacientů s operační tolerancí po transplantaci ledviny s dlouhodobě funkčním štěpem bez imunosuprese. Expese genů asociovaných s tolerancí v periferní krvi pacientů užívajících imunosupresi nebyla zatím podrobně objasněna.

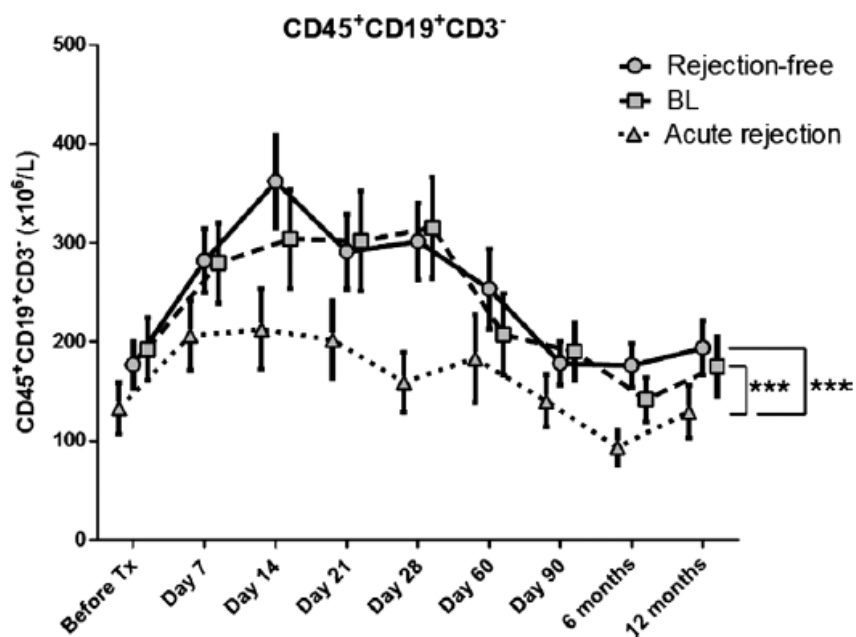
### **Metodika**

V této prospektivní studii jsme měřili expresi 8 vybraných genů popsáných u nemocných s operační tolerancí (MS4A1, CD79B, TCL1A, TMEM176B, FOXP3, TOAG-1, MAN1A1, a TLR5). Vyšetřili jsme vzorky periferní krve u 67 pacientů v době transplantace ledviny a dále 7., 14., 21., 28. den a 2., 3., 6., 9., 12. měsíc po výkonu. Současně byla vyšetřena intrarenální genová exprese v biopsiích štěpu. Použitím průtokové cytometrie jsme stanovili počet B lymfocytů (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>). Porovnali jsme expresní profily pacientů s akutní rejekcí, hraničními změnami a bez rejekce. K analýze longitudinálních dat jsme použili generalizovaný lineární smíšený model s gamma distribucí pro opakované měření, adjustovaný na indukční léčbu.

### **Výsledky**

U pacientů bez rejekce, případně s hraničními změnami jsme pozorovali signifikantně vyšší počet periferních B-lymfocytů v porovnání s pacienty s akutní rejekcí (obr. 7). Ve skupině pacientů s nerejekčním nálezem jsme zjistili signifikantně vyšší expresi genů pro MS4A1 (CD20), TCL1A, CD79B, TOAG-1, and FOXP3 v porovnání s pacienty s rejekcí. Nejvyšší rozdíly jsme pozorovali v průběhu prvních třech měsíců. Naopak, gen pro TMEM176B (TORID) byl upregulován u pacientů s rejekcí. Podobný trend jsme zaznamenali i při porovnání pacientů s hraničními změnami.





**Obr. 7. Absolutní počet periferních B lymfocytů v periferní krvi pacientů s akutní rejekcí, hraničními změnami a u pacientů bez rejekce v 1. roce po transplantaci ledviny. Vyšší počet B lymfocytů jsme pozorovali u pacientů bez akutní rejekce.**

## Diskuse

Úspěšné dlouhodobé přežití štěpů je spojeno se slabou aloimunitní odpovědí. U těchto pacientů není nutná potentní imunosupresivní léčba, která může mít četné vedlejší účinky. Spolehlivý test by pomohl identifikovat pacienty vhodné k minimalizaci léčby. Některé imunitní buňky mají schopnost regulovat a udržet alloimunitní ticho. V minulosti se pozornost soustředila na T lymfocyty. Málo se vědělo o roli B lymfocytů při navození a udržení transplantační tolerance. Myslelo se, že B lymfocyty jsou v první řadě asociované se vznikem akutní protilátkami zprostředkované rejekce a spojené s horší prognózou (Zarkhin et al., 2008). V rozporu s tím, byl nedávno popsán vztah mezi zvýšenou expresí genů pro B-lymfocyty a lepším výsledkem léčby akutní rejekce (Scheepstra et al., 2008) (Viklicky et al., 2010).

U tolerantních pacientů se stabilní renální funkcí bez imunosupresivní léčby byl popsán zajímavý transkripční profil. Nejvýznamnější byl vztah mezi tolerancí a zvýšenou expresí B lymfocytárních transkriptů jako i zvýšeným počtem B lymfocytů

v periferní krvi v porovnání s pacienty s chronickou rejekcí (Louis et al., 2006, Newell et al., 2010). Málo se ví o B-lymfocytární expresi u pacientů se stabilní renální funkcí na imunosupresivní léčbě. Proto jsme provedli 12ti měsíční prospektivní observační studii s monitorací známých ukazatelů operační tolerance. Cílem této práce bylo na základě vyšetření exprese kandidátních genů identifikovat pacienty se slabou autoimunitní odpovědí, kteří by mohli profitovat z minimalizace imunosuprese.

U pacientů bez rejekce jsme pozorovali zvýšení transkriptů asociovaných s tolerancí jak v periferní krvi, tak i v renální tkáni v prvním roce po transplantaci ledviny. Nejvýraznější rozdíl byl v expresi genů asociovaných s funkcí B lymfocytů v prvních 3 měsících po transplantaci.

V regulaci imunitní odpovědi hrají zásadní roli regulační T lymfocyty (Treg). Bylo prokázáno, že FoxP3, hlavní transkripční faktor asociovaný s Treg je downregulovaný v krvi, moči a renální tkáni pacientů s akutní rejekcí a upregulovaný u pacientů bez rejekce (Bestard et al., 2008). Exprese genů asociovaných s tolerancí (TOAG-1 a alpha-1,2-mannosidáza) byla snižena v periferní krvi a renální tkáni pacientů před rejekcí. To by mohlo mít význam v klinické praxi při monitoraci pacientů po transplantaci (Sawitzki et al., 2007). V naší studii jsme zaznamenali vyšší expresi FoxP3 a TOAG-1 v periferní krvi pacientů bez rejekce, zatímco intrarenální exprese TOAG-1 byla u štěpů s akutní rejekcí snižena.

Při rozhodování o osudu štěpu je důležité složení populace B lymfocytů. Naivní a přechodné B lymfocyty jsou spojeny s dlouhodobým přežitím štěpu a tolerancí, zatímco paměťové B lymfocyty s omezeným přežitím štěpu a rejekcí (Kirk et al., 2010). Naše studie potvrdila klinický význam nedávno popsaných ukazatelů tolerance asociovaných s B lymfocyty. Exprese těchto genů byla potlačena v periferní krvi pacientů s časnou akutní rejekcí.

Mnoho studií analyzovalo tolerantní pacienty s dlouhodobou funkcí štěpu. Naše studie poskytla odlišný pohled, když se zabývala ukazateli operační tolerance ve včasném potransplantačním průběhu u pacientů s vysokými dávkami imunosuprese v průběhu akutní rejekce. Ukazatele asociované s naivními a zralými B lymfocyty byly upregulované v periferní krvi pacientů bez rejekce ve včasných měsících po

transplantaci. To by mohlo značit expanzi B lymfocytů při nízké alloimunitní odpovědi. Na konci sledovaného období se tyto rozdíly smazaly.

V této studii jsme analyzovali pacienty s hraničními změnami jakou samostatnou skupinu. Přesto, že Banffská klasifikace nepovažuje hraniční změny za rejekci, mnoho center podává pulzy steroidů k léčbě. Ukázalo se, že pacienti s hraničními změnami reprezentují nehomogenní kohortu s odlišným molekulárním profilem v porovnání s akutní T buňkami zprostředkovanou rejekcí (de Freitas et al., 2012). Zajímavostí je, že v naší studii byla exprese tolerančních transkriptů v periferní krvi a renální tkáni ve skupině s hraničními změnami podobná skupině s nerejekčním nálezem. Tato prospektivní observační studie je první studie, která ověřila vztah a protektivní roli tolerančních transkriptů asociovaných s B lymfocyty u pacientů po transplantaci ledviny na imunosupresivní léčbě.

### **Závěr**

Pozorovali jsme zvýšenou expresi genů pro B lymfocyty u pacientů bez rejekce podobně jako u pacientů s operační tolerancí bez imunosupresivní léčby.

### **Článek byl publikován v časopise *Transplantation*.**

B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2013 Jan 15;95(1):148-54.

*Kompletní znění článku je přiloženo v anglickém jazyce.*

## B-Cell-Related Biomarkers of Tolerance are Up-Regulated in Rejection-Free Kidney Transplant Recipients

Ondrej Viklicky,<sup>1,2,7</sup> Eva Krystufkova,<sup>1</sup> Irena Brabcova,<sup>1</sup> Alena Sekerkova,<sup>3</sup> Peter Wohlfahrt,<sup>4</sup> Petra Hribova,<sup>1</sup> Mariana Wohlfahrtova,<sup>1,2</sup> Birgit Sawitzki,<sup>5</sup> Janka Slatinska,<sup>2</sup> Ilja Striz,<sup>3</sup> Hans-Dieter Volk,<sup>5</sup> and Petra Reinke<sup>6</sup>



**Background.** Molecular signatures have recently been identified in operationally tolerant long-term kidney transplant patients; however, their expression in patients on immunosuppression remains unclear.

**Methods.** In this prospective study, the gene expression profiles of eight selected tolerance-associated genes (*MS4A1*, *CD79B*, *TCL1A*, *TMEM176B*, *FOXP3*, *TOAG-1*, *MAN1A1*, and *TLR5*) in the peripheral blood of 67 kidney transplant recipients at days 0, 7, 14, 21, 28, 60, 90, and at 6 and 12 months, and in graft biopsies were measured. Similarly, using flow cytometry, CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> B-cell counts were evaluated in the follow-up. Expression patterns were compared among patients with biopsy-proven acute rejection, borderline changes, and in rejection-free patients. A generalized linear mixed model with gamma distribution for repeated measures adjusted for induction therapy was used for statistical analysis of longitudinal data and Kruskal-Wallis test for case biopsy data.

**Results.** Compared to patients with rejection, a significantly higher number of peripheral B cells were observed during follow-up in rejection-free patients and in patients with borderline changes. Gene expression patterns of *MS4A1* (*CD20*), *TCL1A*, *CD79B*, *TOAG-1*, and *FOXP3* genes were significantly higher in rejection-free patients as compared to rejection group with the highest differences during the first 3 months. In contrast, *TMEM176B* (*TOR1D*) was up-regulated in the rejection group. Similar trends were also observed between patients with borderline changes and acute rejection. Higher intragraft expression of *TOAG-1* was observed in rejection-free patients.

**Conclusions.** These observations suggest an association of B-cell signatures, seen also in drug-free tolerant patients, with controlled alloimmune response.

**Keywords:** Kidney transplantation, Tolerance, B cell, TCL-1, CD20, Rejection.

(*Transplantation* 2013;95: 148–154)

Successful, long-term kidney transplants have been shown to be associated with reduced alloimmune response. However, immunosuppression therapies can be associated

with several side effects (1), and for many patients, triple drug regimens are not necessary because of weak alloreactive responses. Therefore, the development of reliable tests

This study was supported by a grant from the Internal Grant Agency from the Ministry of Health of the Czech Republic, no. IGA MZCR NS 10517-3/2009, and by the Grant Agency of the Czech Republic, grant no. P301/11/1568.

O.V. is a recipient of a grant from the Internal Grant Agency from the Ministry of Health of the Czech Republic (No. IGA MZCR NS 10517-3/2009) and a grant from the Grant Agency of the Czech Republic (No. P301/11/1568). O.V., B.S., H.-D.V., and P.R. are supported in part also by RISE (EU FP6 program) and Bio-DrIM (EU FP7 program).

The authors declare no conflicts of interest.

<sup>1</sup> Transplant Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>2</sup> Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>3</sup> Department of Clinical and Transplant Immunology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>4</sup> Department of Preventive Cardiology, Cardiology Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

<sup>5</sup> Institute of Medical Immunology and Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité University Medicine, Berlin, Germany.

<sup>6</sup> Department of Nephrology and Internal Intensive Care and Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité University Medicine, Berlin, Germany.

<sup>7</sup> Address correspondence to: Ondrej Viklicky, M.D., Ph.D., Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958, 14021 Prague, Czech Republic. E-mail: ondrej.viklicky@medicon.cz

O.V., H.-D.V., and P.R. participated in designing the research. O.V., E.K., and B.S. participated in writing the paper. O.V., I.B., A.S., P.H., M.W., J.S., and I.S. participated in performing the research. O.V., E.K., and P.W. participated in analyzing the data.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site ([www.transplantjournal.com](http://www.transplantjournal.com)).

Received 3 August 2012. Revision requested 23 August 2012.

Accepted 10 October 2012.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/13/9501-148

DOI: 10.1097/TP.0b013e3182789a24



that may help identify patients suitable for drug minimization is needed.

It has been shown that some immune cells exhibit regulatory functions (2–5) necessary for alloresponse quiescence. While more attention has been focused on regulatory T-cell function, little is known regarding B cells in the context of induction and maintenance of transplantation tolerance. It was thought that B cells were primarily associated with development of antibody-mediated immune response, and B-cell clusters in kidney graft tissue were shown to be associated with poor prognosis (6). More recently, and contrary to this observation, several groups including ours have found B-cell signatures to be associated with better early rejection outcomes (7, 8). Interestingly, operationally tolerant patients who had stable graft function despite the absence of immunosuppressive therapy for more than 1 year presented with distinct molecular signature. Most prominent and reproducible in different studies and crossover validations was the relation between operational tolerance and enhanced expression of B-cell-related transcripts as well as enhanced flow cytometric B-cell counts in the peripheral blood compared to patients with chronic rejection (9–11). However, little is known about the expression of B-cell signatures in stable transplant patients who are still on immunosuppression, and particularly about the kinetics of this particular expression pattern posttransplantation. Therefore, we performed a 12-month prospective observational study to monitor known markers associated with kidney transplant operational tolerance. Here, we demonstrated that B-cell-related and operational tolerance-associated transcripts were up-regulated in peripheral blood in rejection-free kidney transplant recipients as early as within the first year posttransplantation.

## RESULTS

Using flow cytometry and quantitative real-time RT-PCR, peripheral lymphocyte subsets and mRNA expression profiles of eight operational tolerance-associated genes were prospectively monitored in peripheral blood in 67 patients during the first 12 months posttransplantation.

After 1 year follow-up, the patients were categorized into (1) rejection-free group (n=33 [49.2%]), patients without any positive protocol or case biopsy; (2) acute rejection group (n=14 [20.9%]), patients who experienced clinical or subclinical acute rejection confirmed in case biopsies or 3-month protocol biopsies, respectively; and (3) borderline changes group (n=20 [29.9%]), patients in whom borderline changes were confirmed in case biopsies and 3-month protocol biopsies. Acute rejection (diagnosed histologically according Banff '05 classification) group consisted from T-cell-mediated rejection (TCMR) IA in three patients, TCMR IB in one patient, TCMR IIA in two patients, TCMR IIB in two patients, antibody-mediated rejection (ABMR) in four patients, and combined TCMR IIA plus ABMR in another two patients. Rejection episodes occurred at median 7.5 (min 5; max 219) days after transplantation. There was one steroid-resistant rejection treated thereafter with rabbit antithymocyte globulin (rATG) successfully. All other rejections responded to given therapy. Characteristics of all studied groups are shown in Table 1.

### Tolerance Markers in Peripheral Blood

The constantly higher relative and absolute flow cytometric CD19<sup>+</sup> B-cell counts were observed in peripheral blood samples examined from patients without rejection and in patients with borderline changes compared to patients with acute rejection (both  $P < 0.0001$ ; Fig. 1). During

**TABLE 1.** Study group characteristics

	Rejection free	Borderline changes	Rejection	P
Number	33	20	14	
Clinical/subclinical histological findings	—	11/9	10/4	ns <sup>b</sup>
Gender (M/F)	16/17	6/14	4/10	ns <sup>b</sup>
Recipient age (years) <sup>a</sup>	55 [35; 68]	47 [21;70]	58 [32; 78]	<0.05 <sup>c,d</sup>
Donor age (yr) <sup>a</sup>	46 [16; 75]	57 [36; 74]	57 [22; 71]	<0.05 <sup>c,e</sup>
Dialysis vintage (yr) <sup>a</sup>	2.0 [0.2; 6.4]	1.7 [0.6; 5.8]	2.9 [0.6; 9.4]	ns <sup>c</sup>
Retransplantation (n)	9	4	3	ns <sup>b</sup>
HLA MM <sup>a</sup>	3 [1; 5]	3 [2; 6]	4 [1;5]	<0.05 <sup>c,f</sup>
PRA (%) <sup>a</sup>	32 [0; 96]	12 [2; 86]	28 [0; 82]	ns <sup>c</sup>
CIT (hr) <sup>a</sup>	16.4 [7.7; 20.7]	17.0 [12.4; 21.0]	15.5 [10.8; 20.8]	ns <sup>c</sup>
Induction (n/%)	23/69.7	13/65.0	10/71.4	ns <sup>b</sup>
rATG (n/%)	16/48.5	5/25.0	5/35.7	ns <sup>b</sup>
basiliximab (n/%)	7/21.2	8/40.0	5/35.7	ns <sup>b</sup>
TAC/CsA (n)	32/1	19/1	12/2	ns <sup>b</sup>
DGF	5	8	8	<0.05 <sup>b</sup>

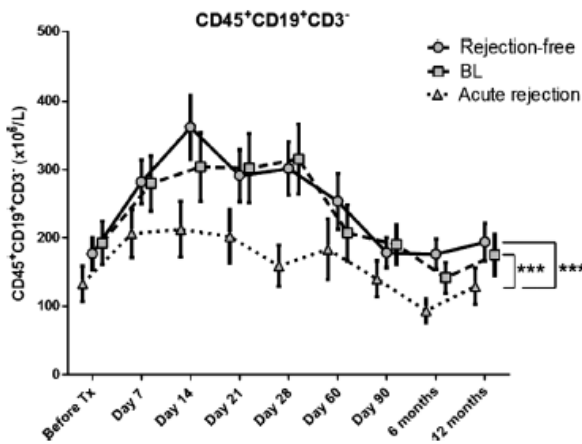
<sup>a</sup> Median [min; max].

<sup>b</sup> Chi-square test P value.

<sup>c</sup> Kruskal-Wallis test P value.

Dunn's Multiple Comparison Test: <sup>d</sup>Significant difference between borderline changes and the rejection group, <sup>e</sup>significant differences between the rejection-free and the borderline change group, and <sup>f</sup>significant differences between the rejection-free and the rejection group.

Basiliximab, anti-IL-2 receptor alpha monoclonal antibody; CIT, cold ischemic time; CsA, cyclosporin A; DGF, delayed graft function; HLA MM, HLA mismatch; PRA, historical panel reactive antibodies; rATG, rabbit antithymocyte globulin; TAC, tacrolimus.

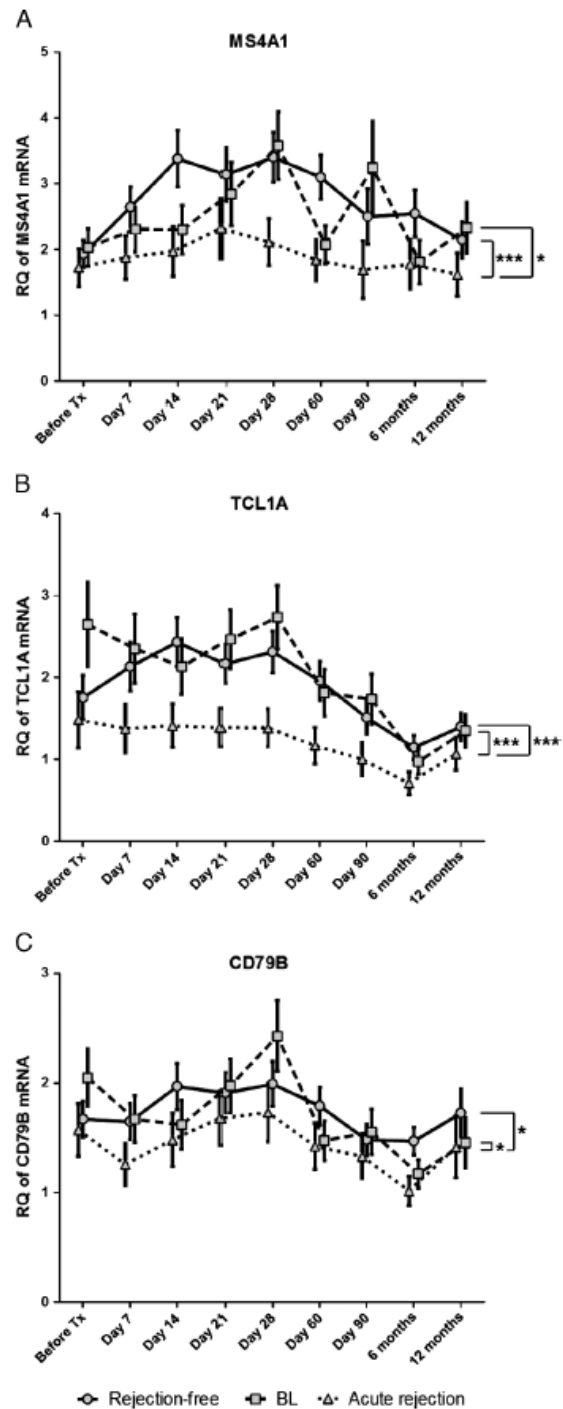


**FIGURE 1.** Absolute numbers of peripheral B cells (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>). B-cell numbers were measured by flow cytometry in peripheral blood of patients with a diagnosis of acute rejection (dotted line), borderline changes (BL, dashed line), or rejection-free patients (solid line) over a 1-year follow-up period. Higher absolute numbers of peripheral blood B cells were observed in rejection-free patients compared to patients who rejected their grafts. Data are presented as estimated marginal means±SEM.

follow-up, all three B-cell-related genes expression levels (*MS4A1*, *TCL1A*, and *CD79B*) were higher in the peripheral blood of rejection-free patients and in patients with borderline changes compared to patients with acute rejection; the differences were more obvious during the first 6 months while at the end of the follow-up the differences were negligible (*MS4A1*,  $P<0.0001$  and  $P<0.05$ , Fig. 2A; *TCL1A*, both  $P<0.0001$ , Fig. 2B; *CD79B*, both  $P<0.05$ , Fig. 2C). No significant differences were observed between patients with borderline changes and rejection-free patients.

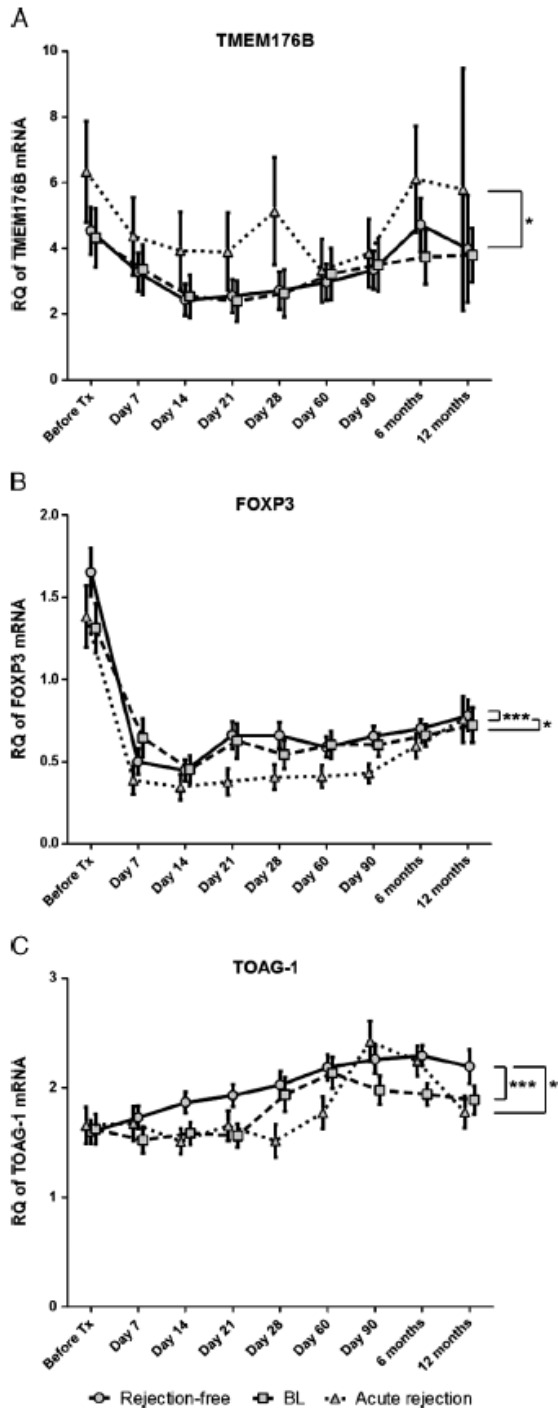
In contrast, *TMEM176B* (an immature dendritic cell marker, known as TORID) expression was up-regulated in acute rejection patients compared rejection-free patients ( $P<0.05$ ; Fig. 3A). No significant differences in *TMEM176B* expression were observed between patients with borderline changes or rejection-free patients. Compared to patients with acute rejection, *FOXP3*, a master transcription factor of regulatory T cell, was up-regulated in rejection-free patients ( $P<0.0001$ ) and in patients presenting with borderline changes ( $P<0.05$ ; Fig. 3B). No significant differences in *FOXP3* expression were observed between patients presenting with either borderline changes or rejection-free patients. The *FoxP3*-to-*MAN1A1* ratio was significantly higher in rejection-free patients compared to acute rejection like the *FoxP3* marker alone (not shown).

*TOAG-1* expression in rejection-free patients was higher compared to patients presenting with either borderline changes ( $P<0.0001$ ) or acute rejection ( $P<0.05$ ; Fig. 3C). No significant differences in *TOAG-1* expression were observed between patients presenting with borderline changes and acute rejection group individuals. Finally, there were no significant differences in *TLR5* gene expression patterns between groups (data not shown). No significant differences were observed in expression levels of all analyzed genes and in peripheral B-cell counts pretransplantation in any group.



**FIGURE 2.** Relative quantities (RQ) of *MS4A1*, *TCL1A*, and *CD79B* mRNA measured by qRT-PCR analysis of peripheral blood from patients with a diagnosis of acute rejection (dotted line), borderline changes (BL, dashed line), or rejection-free patients (solid line) over a 1-year follow-up period. The expression levels of three B-cell-related genes *MS4A1* (A), *TCL1A* (B), and *CD79B* (C) were higher in rejection-free patients during the first months posttransplantation. Data are presented as estimated by marginal means±SEM.





**FIGURE 3.** Relative quantities (RQ) of *TMEM176B*, *FOXP3*, and *TOAG-1* mRNA measured by qRT-PCR in the peripheral blood of patients with a diagnosis of acute rejection (dotted line), borderline changes (BL, dashed line), or rejection-free patients (solid line) during a 1-year follow-up period. Expression of the *TMEM176B* gene (A) was up-regulated in patients with acute rejection and *FOXP3* (B) and *TOAG-1* (C) were down-regulated in rejection-free patients. Data are expressed as estimated marginal means ± SEM.

When discriminating according to the rejection type, the altered expression of B-cell-related genes in peripheral blood were comparable in all rejection groups but were most prominently noticed, along with lowest peripheral B-cell counts, in two patients with repeated T-cell-mediated rejection and combined TCMR (see Figure S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/A749>).

In the multivariate analysis, number of human leukocyte antigen (HLA) mismatches, age of donor and recipient, induction therapy used, and tacrolimus concentration in blood were associated with expression of studied genes. However, even after adjustment for these factors, the difference between groups with and without rejection episode remains significant.

### Tolerance Markers in Kidney Graft Tissues

Little is known about intragraft expression patterns of operational tolerance-associated genes originally described in peripheral blood of operationally tolerant patients. Therefore, we analyzed the expression patterns of the eight operational tolerance-associated genes in specimens from kidney graft case biopsies.

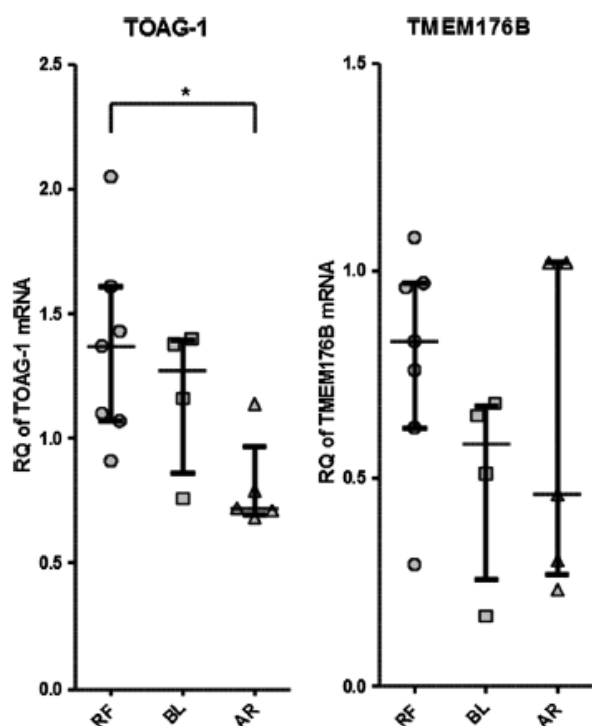
mRNA was isolated in sufficient amounts from kidney graft tissue biopsies in 16 cases in whom rejection was suspected. Biopsies were performed early postsurgery (median 14 days). In seven patients, the case biopsy precluded acute rejection, four patients exhibited borderline changes, and acute rejection was diagnosed in five patients (TCMR in four cases and ABMR in a single case).

Both *TOAG-1* and *TMEM176B* (TORID) genes were up-regulated in biopsies harvested from patients not presenting with acute rejection compared to patients with acute rejection; the differences in *TOAG-1* intragraft expression reached statistical significance ( $P < 0.05$ , Fig 4). There were no significant differences in the expression profiles of other analyzed genes in the biopsies of patients with or without rejection (data not shown).

### DISCUSSION

The aim of this study was to monitor expression patterns of several genes associated with tolerance achieved clinically or experimentally during early-phase posttransplantation in patients with intense immunosuppression in order to see whether tolerance-associated markers might discriminate low or high responders quite early and might possibly guide minimizing immunosuppression. Over a 12-month period, this prospective study identified the up-regulation of several operational tolerance-related genes in the peripheral blood and kidney graft tissues of rejection-free patients. Most differently regulated genes in the peripheral blood were associated with B-lymphocyte function and the most significant differentially expressed transcripts were identified within the first 90 days.

Analyzing the data, there are clear evidences for immunoregulation in rejection-free patients compared to acute rejection group. Regulatory T cells (Treg) have been suggested to play a critical role in immune response regulation (12). *FOXP3*, the master transcriptional factor associated with Treg cells, was shown to be down-regulated in blood, urine, and



**FIGURE 4.** Relative quantities (RQ) of *TOAG-1* and *TMEM176B* mRNA were measured in kidney graft biopsy specimens in patients with histological signs of acute rejection (AR), borderline changes (BL), and from rejection-free patients (RF). Significant up-regulation of *TOAG-1* gene in biopsies without acute rejection was observed. Data are expressed as the median and interquartile range.

kidney graft tissues of patients presenting with acute rejection and up-regulated in patients with successful grafts (13–15). A role for both tolerance-associated gene 1 (*TOAG-1*) and the alpha-1,2-mannosidase gene were evaluated in experimental models. Expression of both genes was down-regulated in peripheral blood and graft tissues prior to rejection, suggesting that these markers may be useful for monitoring in clinical transplantation (16). A significant difference in the *FOXP3*-to- $\alpha$ -1,2-mannosidase expression profile ratio was observed between patients with operational tolerance and chronic rejection (10). In the present study, patients who did not experience acute rejection during the first year had consistently higher *FOXP3* expression levels and similarly *FOXP3*-to- $\alpha$ -1,2-mannosidase expression ratio (not shown) in peripheral blood. Similarly, the expression pattern of *TOAG-1* gene was constantly increasing during the follow-up in patients without rejection. Moreover, intragraft expression of *TOAG-1* gene was lower during early acute rejection in our study, suggesting this marker to be further validated in the clinical transplantation.

Recently, the composition of the B-cell compartment was shown to be important in determining graft outcome. Naïve and transitory B cells have been suggested to be associated with long-term graft function and operational tolerance; in contrast, memory B cells have been associated with limited graft survival and rejection (10, 17, 18). This study validated the clinical relevance of recently described

B-cell-related markers of operational tolerance as early as within the first year posttransplantation. These genes were down-regulated in peripheral blood during the initial posttransplantation period in patients with acute rejection. Of note, the most reduced flow cytometric peripheral B-cell counts and the expression of B-cell-related transcripts in peripheral blood were observed in two patients with repeated T-cell-mediated rejection and combined ABMR. In the Indices of Tolerance study (10), microarray analysis identified *CD79B* (a B-lymphocyte antigen receptor complex component that includes surface immunoglobulin) as a top operational tolerance discriminating gene. In our study, there was significantly higher expression of this gene in peripheral blood observed in patients with successful transplants during follow-up.

The most prominent differences in gene expression levels observed in this report were observed in two genes, *MS4A1* and *TCL1*. *MS4A1* (*CD20*) is a transmembrane protein expressed on premature and mature B cells, and *CD20* transcripts have been shown to be differentially expressed in tolerant kidney transplant recipients compared to other patient groups (10, 11, 19). Similar differences were observed in our study also in T-cell leukemia/lymphoma 1 gene (*TCL1*). The physiological expression of this oncoprotein is limited to the early developmental stages of cells (including immune cells), and its expression was significantly elevated in naïve B cells and B cells with prolonged survival (20, 21). Specifically, expression of *TCL1A* appears to be important because the expression of this protein was highest in immature cells, but low or absent in mature B cells (22). In this study, genes associated with naïve and immature B cells were up-regulated in peripheral blood during several posttransplantation months. Recently, *CD20* and *TCL1* were found to be differentially regulated in tolerant patients not taking immunosuppressive drugs compared to patients with stable grafts (10, 11). Similarly Brouard et al. (19) compared gene expression profiles between operationally tolerant patients and patients with interstitial fibrosis and tubular atrophy and found up-regulation of *CD20* and *TCL1* in tolerant patients.

All three widely cited studies (10, 11, 19) analyzed operational long-term kidney transplant patients, but clearly there was a deficiency in analyzing tolerance markers during early-phase posttransplantation if the patients were still on high-dose immunosuppression and during acute rejection. Thus, our prospective study provided a different perspective. First, markers associated with naïve and immature B cells were consistently up-regulated in peripheral blood during the initial months posttransplantation of rejection-free patients. However, by the end of the follow-up period, these differences nearly disappeared. This might indicate that B-cell expansion is associated with a “quiet” immune system (or even might be responsible for this). At the end of the follow-up, there was a clear trend towards reduced expression of B-cell-related tolerance markers in rejection-free patients rather than their increase in the rejection cohort. Thus, the effect of more intensive antirejection immunosuppression in patients with rejection was likely without any effect on our observation.

One of the genes analyzed, *TMEM176B*, originally described as *TORID*, was described as overexpressed in tolerated heart allografts in a model of tolerance induced by donor-specific blood transfusion with long-term survival without



signs of chronic rejection (23). Because this molecule was preferentially expressed on resting macrophages and dendritic cells, we can only speculate as to its role in active tolerogenic pathways (23). Our observation demonstrating increased expression of this gene in blood of patients with acute rejection suggested that it was associated with alloantigen presentation and inflammation, suggesting that the tolerogenic potential of this molecule remains to be defined.

In the present study, patients with biopsy-proven borderline changes were analyzed as an independent cohort. Despite the fact that the Banff classification system did not consider borderline changes as rejection, many centers administer i.v. steroids to treat patients presenting with these changes. Recently, it has become clearer that patients presenting with borderline changes represent a nonhomogenous diagnostic group presenting with different molecular pathology compared to that observed for TCMR (24). Interestingly, in this study tolerance-associated transcript expression patterns in peripheral blood and in graft tissues were similar between rejection-free patients and patients with biopsy-proven borderline changes.

In this study, we used general linear mixed model for statistical analysis because it allowed us to increase the statistical power to detect differences in groups with small sample size. Low power due to low sample size did not allow us to test temporal differences among groups, and this fact may represent a limitation of the present study.

This prospective observational study, to our knowledge, is the first to validate the association and putative protective role of tolerance-associated, B-cell-related transcripts in kidney transplant patients still on standard immunosuppression. Whether this observation forms the ground for a more simplified and safer drug minimization (or elimination) strategy can only be answered following prospective biomarker-based interventional studies.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and Samples

Consecutive deceased donor kidney transplant recipients (n=75) were enrolled in this single-center study between September 2009 and November 2010. Informed written informed consent was obtained from all participants, and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine (No. 608-08-10).

Sufficient mRNA was obtained from 67 patients during seven out of nine sampling time points. Patients were treated according to the center's immunosuppression treatment protocol consisting of triple maintenance therapy that comprised a calcineurin inhibitor (tacrolimus or cyclosporin A), mycophenolate mofetil, and corticosteroids with or without induction therapy based on their immunological risk. Patients with panel reactive antibodies (PRA) greater than or equal to 50% or patients with previous renal transplantation received 1 to 1.5 mg/kg/day of rATG (Thymoglobulin; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA, n=26) in two to seven doses during week 1 postsurgery. Patients with PRA 20% to 49% or those who received a kidney from an extended criteria donor were treated with 20 mg of basiliximab (Simulect; Novartis, Basel, Switzerland, n=20) on days 0 and 4. Low-risk patients (PRA <20%) received no induction therapy (n=21). Peripheral blood samples were collected at the following time points: before transplantation and on days 7, 14, 21, 28, 60, 90, and 6 and 12 months posttransplantation.

### Histology and Treatment of Rejection

Kidney graft biopsies were performed based on clinical indications (case biopsies) or as defined by the protocol 90 days after transplantation. In

total, 76 case biopsies and 64 protocol biopsies were performed. Acute rejection was diagnosed according to the Banff '05 classification (25). Borderline changes and T-cell-mediated rejection (TCMR) grades I and IIA were treated by administering 1.5 to 2 g methylprednisolone, TCMR grades IIB and III and steroid-resistant TCMR were treated using rATG (10 doses; 2 mg/kg on day 1 and 1 mg/kg for 2–10 days), and antibody-mediated rejection (AMR) was treated by plasma exchange and intravenous immunoglobulin alternately over a 10-day period.

### Flow Cytometry and Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

Venous blood samples were collected into sterile tubes containing EDTA. Lymphocytes from peripheral blood (100  $\mu$ L; approximately  $1 \times 10^6$  cells) were labeled with a four-color monoclonal antibody panel CYTO-STAT tetraChrome CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) diluted in PBS-BSA (phosphate buffered saline-bovine serum albumin) buffer for 20 min at room temperature in the dark. Red blood cells were lysed using OptiLyseC (Beckman Coulter). B cells were defined as CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>.

Following staining, samples were analyzed using an FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter) with CxP and Kaluza software (Beckman Coulter). Flow cytometric analyses were performed with at least 100 gated events.

### Gene Expression Analysis and RNA Isolation

Peripheral blood was drawn directly into PAXgene tubes (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol, frozen, and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analyzed. Whole-blood RNA was extracted using the PAXgene Blood RNA Kit including DNase I treatment (Qiagen) using a QIA cube machine.

A small portion of renal graft tissues were stored in RNeasy Lysis Buffer (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA) immediately after the biopsy was harvested and stored at  $-20^\circ\text{C}$  or  $-80^\circ\text{C}$  for further gene expression analysis. High-quality, total RNA was prepared from renal graft tissue samples using RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen), and RNA was eluted in 30  $\mu$ L of RNase-free water. The purity and concentration of the RNA were assessed using an ultraviolet-visible spectrophotometer (NanoDrop 2000; Thermo Scientific). The RNA isolation method routinely used in our laboratory was validated and standardized on reference samples thereby eliminating errors and ensuring the same standards across all measurements. The quality of RNA samples obtained by the standard isolation protocol was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). An RNA integrity number of 8 to 10 indicated high-quality RNA suitable for further analysis. Expression patterns of operational tolerance-associated genes were then evaluated in patients for whom sufficient amounts of mRNA were isolated.

### Quantitative RT-PCR Analysis

Total RNA (2  $\mu$ g) isolated from blood or tissue samples was used for complementary DNA synthesis using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was treated with DNase and only complementary DNA samples without genomic DNA contamination were used for TaqMan assay analyses. Gene expression profiles of the eight selected tolerance-associated genes (*MS4A1*, *CD79B*, *TCL1A*, *TMEM176B*, *FOXP3*, *TOAG-1* [*C3orf23*], *MAN1A1*, and *TLR5*) were determined using quantitative real-time RT-PCR ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) using GAPDH and PGK1 as internal controls for renal biopsy tissues and HPRT and PGK1 as reference genes for whole blood samples. cDNA from one control blood sample served as the calibrator, and for biopsy samples, commercial kidney RNA was used. mRNA quantification was performed in triplicate using a predesigned TaqMan Gene Expression Assay (Hs00544818\_m1 [*MS4A1*], Hs00236881\_m1 [*CD79B*], Hs00951350\_m1 [*TCL1A*], Hs00962650\_m1 [*TMEM176B*], Hs00203958\_m1 [*FOXP3*], Hs00603313\_m1 [*C3orf23*], Hs00195458\_m1 [*MAN1A1*], and Hs00152825\_m1 [*TLR5*]; Applied Biosystems) and fast protocol (TaqMan Fast Advanced Master Mix; Applied Biosystems). RT-qPCR amplification was performed on an ABI Prism 7900 HT Sequence Detection system (Applied Biosystems). Ninety-six-well plates were analyzed as relative quantification

(RQ) and the RQ manager 1.2. software for automated data analysis was used (Applied Biosystems).

### Statistical Analyses

Data are expressed as estimated marginal means±SEM, median (min; max), and interquartile range or absolute numbers (n) as appropriate. Characteristics of groups with acute rejection, borderline changes, or without rejection were compared using the Kruskal-Wallis test for continuous variables and by the chi-square test for categorical variables. A generalized linear mixed model for repeated measures adjusted for induction therapy was used for testing differences in peripheral blood gene expression and B-cell absolute numbers between groups. Due to non-normal distribution of data with long right tails, we used gamma regression of the dependent variable. The Kruskal-Wallis test was used for testing differences in gene expression in case biopsy specimens. Separate multivariate analyses adjusted for various factors that differed between the groups in univariate analyses were done to test for differences in gene expression profiles between groups. Calculations were done using SPSS 20 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A two-sided *P* value ≤0.05 was considered statistically significant.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Romana Polackova, Martina Ondrakova, Katarina Barcikova, Eva Faberova, and Adela Sajdlova for their technical assistance and coordination of the sample collection as well as to the patients and nurses for their cooperation and help.

### REFERENCES

- Jardine AG, Gaston RS, Fellstrom BC, et al. Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet* 2011; 378: 1419.
- Li XC, Turka LA. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 577.
- Mauri C, Blair PA. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 636.
- Hutchinson JA, Riquelme P, Geissler EK. Human regulatory macrophages as a cell-based medicinal product. *Curr Opin Organ Transplant* 2012; 17: 48.
- Dugast AS, Vanhove B. Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation. *Clin Exp Immunol* 2009; 156: 25.
- Zarkhin V, Kambham N, Li L, et al. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int* 2008; 74: 664.
- Scheepstra C, Bemelman FJ, van der Loos C, et al. B cells in cluster or in a scattered pattern do not correlate with clinical outcome of renal allograft rejection. *Transplantation* 2008; 86: 772.
- Viklicky O, Hribova P, Volk HD, et al. Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 173.
- Louis S, Braudeau C, Giral M, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81: 398.
- Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1848.
- Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1836.
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 8.
- Bestard O, Cruzado JM, Rama I, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2020.
- Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I, et al. Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 2576.
- Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353: 2342.
- Sawitzki B, Bushell A, Steger U, et al. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant* 2007; 7: 1091.
- Kirk AD, Turgeon NA, Iwakoshi NN. B cells and transplantation tolerance. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 584.
- Heidt S, San Segundo D, Shankar S, et al. Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplantation* 2011; 92: 1.
- Brouard S, Mansfield E, Braud C, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15448.
- Noguchi M, Ropars V, Roumestand C, et al. Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB J* 2007; 21: 2273.
- Tabrizi SJ, Niino H, Masui M, et al. T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. *J Immunol* 2009; 182: 1490.
- Kuraishy AI, French SW, Sherman M, et al. TORC2 regulates germinal center repression of the TCL1 oncoprotein to promote B cell development and inhibit transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10175.
- Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M, et al. Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIbeta family overexpressed in tolerated allografts. *Am J Transplant* 2005; 5: 2143.
- de Freitas DG, Sellares J, Mengel M, et al. The nature of biopsies with "borderline rejection" and prospects for eliminating this category. *Am J Transplant* 2012; 12: 191.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518.

## 7. DISKUSE

Výsledky předkládané disertační práce jsou *in extenso* diskutovány v příložených a recenzovaných člancích; zde uvádím jejich souhrn.

V prvním tématickém okruhu této práce jsme se věnovali analýze expresního profilu vybraných genů ve 3 následných biopsiích v průběhu jednotlivých fází ischemicko/reperfuzního poškození. První biopsie byla provedena v čase odběru ledviny k transplantaci (dárcovská biopsie), další v průběhu samotné transplantace a to na konci ischemie (předimplantační biopsie) a 30 minut po reperfuzi orgánu (poimplantační biopsie). I přes absenci histologických abnormalit jsme pozorovali změnou expresi genů ve vztahu k poškození štěpu. Ve srovnání s “molekulárním tichem” studené ischemie, vedla reperfuze k enormním změnám transkriptomu, ke zvýšené expresii 16 genů asociovaných s aktivací přirozené a adaptivní imunitní odpovědi a apoptózy a k významné heterogenitě transkripčního profilu v poimplantačních biopsiích. Možným vysvětlením molekulárního ticha během ischemie je potlačení metabolismu jako základního fyziologického mechanismu. Naše data naznačila, že molekulární profilování přesahuje hranice histopatologie. Použitím “molekulárního mikroskopu” jsme byli schopni odhalit i diskrétní změny, ke kterým dochází v průběhu ischemicko/reperfuzního poškození.

Podařilo se nám identifikovat potencionální rizikové faktory opožděného rozvoje funkce štěpu. Ledviny, u kterých došlo k opožděnému rozvoji funkce, vykazovaly vyšší skóre pro tubulární atrofii a nízkou expresi genu pro Netrin-1. Toto poukazuje na důležitou roli kvality tubulů v časném potransplantačním průběhu. Netrin-1 patří mezi tzv. faktory přežití, které napomáhají regeneraci tím, že stimulují proliferaci přežívajících renálních tubulárních buněk, inhibují apoptózu a zmírňují následky ischemicko/reperfuzního poškození. V naší práci jsme popsali sníženou expresi genu pro Netrin-1 ve štěpech s opožděným rozvojem funkce štěpu.

Domníváme se, že vyšetření exprese pro Netrin-1 by mohlo pomoci lépe porozumět vulnerabilitě dárcovské ledviny vůči I/RI., zvláště u ledvin od dárců s rozšířenými kritérii s již preexistujícím poškozením. Kombinace konvenčních histopatologických metod



s technikami molekulární patologie by mohla představovat účinný nástroj k identifikaci dárcovských ledvin v riziku opožděného rozvoje funkce.

V další části jsme se věnovali predikci rizika opožděného rozvoje funkce štěpu. Integrovaným přístupem, použitím histopatologického skóre dárcovské biopsie a klinické charakteristiky dárce a příjemce jsme se pokusili identifikovat faktory, které by mohly pomoci lépe předpovědět opožděný rozvoj funkce štěpu, zvláště u ECD dárců. Po zhodnocení velkého množství dárcovských biopsií (n=344) jsme vytvořili vlastní kompozitní skóre, tzv. CIV skóre, které nezávisle predikovalo DGF ve 126 případech. Toto inovativní kompozitní CIV skóre mělo dohromady s klinickou charakteristikou dárce lepší prediktivní hodnotu než tradiční souhrné Banffské skóre s klinickou charakteristikou dárce. Příjemci ledvin s CIV skóre  $\geq 1$  od dárce staršího 51 let a po anoxickém poškození mozku byli ve vysokém riziku opožděného rozvoje funkce štěpu. Naše výsledky podporují roli tradičních rizikových faktorů DGF (např. věk dárce, hladina sérového kreatininu, anoxické poškození mozku dárce), ale zároveň poukazují na význam intersticiální fibrózy (CI) a fibrointimálního ztlustění (CV) v histologickém hodnocení dárcovské ledviny. Kromě toho naše studie zdůrazňuje význam histologického vyšetření u všech dárcovských ledvin včetně SCD dárců, protože bylo prokázáno, že SCD ledviny s CIV skóre  $> 1$  jsou ve srovnatelném riziku DGF jako ledviny od ECD dárců. Podobně i skupina ECD ledvin představuje poměrně heterogenní kohortu s různou mírou rizika DGF dle CIV skóre.

Dále jsme v naší práci srovnávali transkripční profil imunologicky vysoce rizikových pacientů po indukci dvěma druhy antithymocytárních globulinů a hodnotili vliv opožděného rozvoje funkce štěpu na molekulární profil. Ukázali jsme, že i přes normální morfologický nález v tříměsíční protokolární biopsii a stabilní renální funkci je intrarenální transkriptom u pacientů léčených různou indukční terapií (Thymoglobulin vs. ATG-F) odlišný. Transkriptom vysoce rizikových pacientů po indukci Thymoglobulinem byl podobný nízkorizikové skupině bez indukce.

Indukce Thymoglobulinem byla spojena s potlačením exprese genů signální dráhy pro NF- $\kappa$ B, asociovaných s funkcí dendritických buněk, chemoatrakcí, apoptózou a kostimulací, tj. s potlačením aktivity mechanismů, které se účastní jak přirozené, tak adaptivní imunitní odpovědi. V naší studii jsme prokázali, že indukční terapie

Thymoglobulinem navozuje u imunologicky vysoce rizikových pacientů transkripční profil podobný nízkorizikovým pacientům bez indukční léčby a že tento profil je odlišný od pacientů léčených ATG-F. Homogenita genového expresního profilu u pacientů po indukční léčbě Thymoglobulinem a u pacientů bez indukce naznačuje podobnou úroveň aktivace imunitní odpovědi ve štěpu i přes zjevné rozdíly v imunologickém riziku. Vzhledem k vyšší incidenci opožděného rozvoje funkce štěpu po indukci ATG-F nás zajímalo, jestli pozorovaný rozdíl v transkripčním profilu není důsledkem DGF. Doplňující experiment neprokázal rozdílnou expresi kandidátních genů mezi štěpy s opožděným a okamžitým rozvojem funkce štěpu, což podpořilo teorii, že pozorované rozdíly jsou důsledkem rozdílné indukční IS léčby. Domníváme se, že potlačení aktivity signální dráhy pro NF- $\kappa$ B po indukci Thymoglobulinem by mohla svědčit pro účinnější alloimunitní regulaci a vysvětlovat úspěch této biologické léčby v klinické praxi.

V poslední části naší práce jsme se zabývali vyšetřením exprese genů asociovaných s operační tolerancí v periferní krvi a ve štěpu u pacientů s imunosupresivní léčbou. Cílem této práce bylo na základě vyšetření exprese kandidátních genů identifikovat pacienty se slabou alloimunitní odpovědí, kteří by mohli profitovat z minimalizace imunosuprese.

Zjistili jsme, že pacienti bez rejekce, příp. s hraničními změnami mají vyšší počet periferních B-lymfocytů a signifikantně vyšší expresi genů asociovaných s tolerancí (MS4A1, TCL1A, CD79B, TOAG-1, FOXP3). Naopak, v periferní krvi pacientů s akutní rejekcí došlo ke snížení exprese transkriptů tolerance asociovaných s B lymfocyty. V minulosti se myslelo, že T lymfocyty, resp. regulační T lymfocyty (Tregs), jsou důležité při navození a udržení transplantační tolerance (Sakaguchi et al., 2006). B lymfocyty byly převažně spojovány se vznikem akutní protilátkami zprostředkované rejekce a horší prognózou pro štěp (Zarkhin et al., 2008). V rozporu s tím byl nedávno popsán vztah mezi zvýšenou expresí genů pro B-lymfocyty a lepším výsledkem léčby akutní rejekce (Scheepstra et al., 2008, Viklicky et al., 2010). Naše práce potvrdila roli B lymfocytů při udržení slabé alloimunitní odpovědi, když u pacientů bez rejekce byla pozorována výrazně zvýšená aktivita ukazatelů tolerance asociovaných s B lymfocyty. Mnoho studií analyzovalo pacienty s operační tolerancí s dlouhodobou funkcí štěpu bez imunosupresivní léčby. Naše studie poskytla odlišný pohled, když ověřila vztah a

protektivní roli tolerančních transkriptů asociovaných s B lymfocyty u pacientů po transplantaci ledviny na imunosupresivní léčbě.

Naše a jiné práce poukazují na důležitost vývoje nových prediktorů k identifikaci pacientů v riziku opožděného rozvoje funkce a rejekce, kteří by profitovali z individualizace imunosupresivního režimu a zlepšení dlouhodobých výsledků transplantace.

## 8. Závěry

1. Analýzou dárců ledvin jsme zjistili, že nízká kvalita tubulárních buněk a nízká exprese genu pro Netrin-1 souvisí s opožděným rozvojem funkce štěpu. Netrin-1 je tzv. faktor přežití, který hraje protektivní roli při zotavení z ischemicko/reperfuzního poškození. V budoucnu by cílená terapeutická intervence mohla pomoci snížit výskyt DGF v orgánech citlivých k ischemicko/reperfuznímu poškození. Zatímco v průběhu reperfuzního poškození došlo ke vzniku jen minimálních histopatologických abnormalit, na molekulární úrovni jsme pozorovali výraznou aktivaci přirozené a adaptivní imunitní odpovědi a apoptózy. Ischémie byla charakterizována relativním molekulárním tichem. Kombinace konvenčního histologického přístupu a molekulární patologie by mohla představovat účinný nástroj k identifikaci ledvin v riziku opožděného rozvoje funkce štěpu.
2. Nové kompozitní histologické skóre by mohlo spolu s klinickou charakteristikou dárce lépe předpovědět riziko opožděného rozvoje funkce po transplantaci ledviny než konvenční souhrnné Banffské skóre. Kromě toho by kompozitní CIV skóre mohlo pomoci identifikovat méně rizikovou podskupinu ECD-pozitivních dárců, jejichž orgány by nemusely být nezbytně určeny starším příjemcům a nevyžadovaly by individualizaci imunosupresivní léčby. Výsledky naše studie podporují provádění dárcovských biopsií ve všech ledvinách bez ohledu na příslušnost k ECD klasifikaci.
3. I přes normální morfologický nálezný v tříměsíční protokolární biopsii a stabilní renální funkci je intrarenální transkriptom u pacientů léčených různou indukční terapií (Thymoglobulin vs. ATG-F) odlišný. U vysoce rizikových pacientů po indukci Thymoglobulinem byl transkriptom podobný nízkorizikové skupině bez indukce. Domnívame se, že potlačení aktivity signální dráhy pro NF- $\kappa$ B po indukci Thymoglobulinem by mohlo svědčit pro účinnější alloimunitní regulaci a vysvětlovat úspěch této biologické léčby v klinické praxi.
4. V periferní krvi a renální tkáni pacientů bez rejekce užívajících standardní imunosupresi jsme prokázali zvýšenou expresi genů asociovaných s operační tolerancí. Většina těchto zvýšeně exprimovaných genů byla spojena s funkcí B-lymfocytů. Největší rozdíl byl zaznamenán zejména během prvních 90 dní po transplantaci. Zda toto pozorování

povede k jednoduché a bezpečné minimalizaci, případně eliminaci imunosuprese, ukáží prospektivní intervenční studie založené na monitoraci biologických ukazatelů.

## 9. Conclusions

1. Analysis of donor kidneys identified poor tubular cell quality and low Netrin-1 expression levels to be associated with DGF. Netrin-1 is a survival factor that plays a protective role in recovery from ischemia/reperfusion injury. In the future, targeted therapeutic intervention might help to decrease the incidence of DGF in organs susceptible to ischemia/reperfusion injury. Despite minimal histopathological abnormalities occurring during reperfusion injury, reperfusion was associated with enhanced activation of innate and adaptive immune responses and apoptotic programs, contrary to relative molecular silence of ischemia. Taking together, the combination of both conventional histology and molecular pathology techniques during transplantation surgery may represent a more accurate tool to discriminate grafts at risk for DGF.
2. We introduced a novel composite histologic score, which, along with clinical variables, may better predict the risk of DGF than conventional total Banff score. Moreover, the composite CIV score might help to identify ECD-positive subjects at lower risk for DGF whose organs do not have to be necessarily allocated to older recipients. Supposedly, their acceptance would not require use of specific immunosuppressive protocol. Based on the study results, we suggest donor biopsies to be performed as a routine praxis in all kidneys irrespective of ECD classification.
3. Thymoglobulin and ATG-F induction induce a different intrarenal transcript profile in patients 3 months posttransplantation despite normal morphology and stable kidney graft function. Moreover, induction therapy with Thymoglobulin in high-risk patients was shown to induce an identical transcriptome profile as in low-risk subjects who had not received induction therapy. The differential gene expression, which resulted in lower activity of NF- $\kappa$ B-dependent pathways, seems to favor better alloimmune regulation in Thymoglobulin induction.

4. The up-regulation of several operational tolerance-related genes in the peripheral blood and kidney graft tissues of rejection-free patients in kidney transplant patients still on standard immunosuppression were identified. Most differently regulated genes in the peripheral blood were associated with B-lymphocyte function, mainly within the first 90 days after kidney transplantation. Whether this observation forms the ground for a more simplified and safer drug minimization or possibly drug elimination strategy can only be answered following prospective biomarker-based interventional studies.



## Literatura

AbouZahr C, Cleland J, Coullare F, et al. The way forward. *Lancet* 2007;370(9601): 1791-9.

Akl A, Ismail AM, Ghoneim M. Prediction of graft survival of living-donor kidney transplantation: nomograms or artificial neural networks? *Transplantation* 2008;86(10): 1401-6.

Allanach K, Mengel M, Einecke G, et al. Comparing microarray versus RT-PCR assessment of renal allograft biopsies: similar performance despite different dynamic ranges. *Am J Transpl* 2008;8(5): 1006-15.

Angelescu M, Kraus T, Wiesel M, et al. Assessment of renal graft function by perioperative monitoring of cortical microcirculation in kidney transplantation. *Transplantation* 2003;75(8): 1190-6.

Anglicheau D, Loupy A, Lefaucheur C, et al. A simple clinico-histopathological composite scoring system is highly predictive of graft outcomes in marginal donors. *Am J Transpl* 2008;8(11): 2325-34.

Archer KJ, Mas VR, O'Brien TR, et al. Quality assessment of microarray data in a multicenter study. *Diagnostic molecular pathology : Am J Surg Pathol, part B* 2009;18(1): 34-

Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, et al. Protective effect of a new C5a receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* 2002;103(2): 260-7.

Avihingsanon Y, Ma N, Pavlakis M, et al. On the intraoperative molecular status of renal allografts after vascular reperfusion and clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(6): 1542-8.

Bajwa M, Cho YW, Pham PT, et al. Donor biopsy and kidney transplant outcomes: an analysis using the Organ Procurement and Transplantation Network/United Network for Organ Sharing (OPTN/UNOS) database. *Transplantation* 2007;84(11): 1399-405.

Bestard O, Cruzado JM, Rama I, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(10): 2020-6.

Bodonyi-Kovacs G, Putheti P, Marino M, et al. Gene expression profiling of the donor kidney at the time of transplantation predicts clinical outcomes 2 years after transplantation. *Hum Immunol* 2010;71(5): 451-5.

Bonventre JV, Colvin RB. Adhesion molecules in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996;5(3): 254-61.

Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transpl* 2006;6(4): 652-8.

Bosmans JL, Woestenburg A, Ysebaert DK, et al. Fibrous intimal thickening at implantation as a risk factor for the outcome of cadaveric renal allografts. *Transplantation* 2000;69(11): 2388-94.

Bromberg JS, Heeger PS, Li XC. Evolving paradigms that determine the fate of an allograft. *Am J Transpl* 2010;10(5): 1143-8.

Bunnag S, Einecke G, Reeve J, et al. Molecular correlates of renal function in kidney transplant biopsies. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(5): 1149-60.

Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002;29(1): 23-39.

Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury. *Transplantation* 2003;76(1): 50-4.

Cecka JM. The OPTN/UNOS Renal Transplant Registry. *Clinical transplants* 2005: 1-16.

Cicciarelli J, Cho Y, Mateo R, et al. Renal biopsy donor group: the influence of glomerulosclerosis on transplant outcomes. *TransplProc* 2005;37(2): 712-3.

Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, et al. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63(11): 1611-5.

Cosio FG, Grande JP, Larson TS, et al. Kidney allograft fibrosis and atrophy early after living donor transplantation. *Am J Transpl* 2005;5(5): 1130-6.

Cosio FG, Grande JP, Wadei H, et al. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transpl* 2005;5(10): 2464-72.

Cravedi P, Maggiore U, Mannon RB. Low-density array PCR analysis of reperfusion biopsies: an adjunct to histological analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25(12): 4077-86.

Dawidson IJ, Sandor ZF, Coopender L, et al. Intraoperative albumin administration affects the outcome of cadaver renal transplantation. *Transplantation* 1992;53(4): 774-82.

De Creus A, Abe M, Lau AH, et al. Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin. *J Immunol* 2005;174(4): 2037-45.

de Freitas DG, Sellares J, Mengel M, et al. The nature of biopsies with "borderline rejection" and prospects for eliminating this category. *Am J Transpl*;12(1): 191-201.

DeVries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, et al. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. *Semin Immunol* 2003;15(1): 33-48.

Eapen G, Hinduja A, Abraham G, et al. Does implantation biopsy help in predicting renal allograft management and outcome? *Transplant Proc* 2000;32(7): 1795.

Eardley KS, Kubal C, Zehnder D, et al. The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008;74(4): 495-504.

Eckardt KU, Kasiske BL. Kidney disease: improving global outcomes. *Nat Rev Nephrol* 2009;5(11): 650-7.

Edelstein CL, Ling H, Schrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney Intl* 1997;51(5): 1341-51.

Edwards EB, Posner MP, Maluf DG, et al. Reasons for non-use of recovered kidneys: the effect of donor glomerulosclerosis and creatinine clearance on graft survival. *Transplantation* 2004;77(9): 1411-5.

El-Husseini A, Sabry A, Zahran A, et al. Can donor implantation renal biopsy predict long-term renal allograft outcome? *Am J Nephrol* 2007;27(2): 144-51.

Escofet X, Osman H, Griffiths DF, et al. The presence of glomerular sclerosis at time zero has a significant impact on function after cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 2003;75(3): 344-6.

Famulski KS, Broderick G, Einecke G, et al. Transcriptome analysis reveals heterogeneity in the injury response of kidney transplants. *Am J Transpl* 2007;7(11): 2483-95.

Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, et al. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. *Blood* 2008;111(7): 3675-83.

Foss A, Heldal K, Scott H, et al. Kidneys from deceased donors more than 75 years perform acceptably after transplantation. *Transplantation* 2009;87(10): 1437-41.

Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, et al. Glomerulosclerosis as a determinant of posttransplant function of older donor renal allografts. *Transplantation* 1995;60(4): 334-9.

Giral-Classe M, Hourmant M, Cantarovich D, et al. Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney Intl* 1998;54(3): 972-8.

Grossberg JA, Reinert SE, Monaco AP, et al. Utility of a mathematical nomogram to predict delayed graft function: a single-center experience. *Transplantation* 2006;81(2): 155-9.

Halloran PF, Homik J, Goes N, et al. The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant Proc* 1997;29(1-2): 79-81.

Halloran PF, Hunsicker LG. Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *Am J Transpl* 2001;1(2): 115-20.

Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 1999;17(2-3): 58-65.

Hauser P, Schwarz C, Mitterbauer C, et al. Genome-wide gene-expression patterns of donor kidney biopsies distinguish primary allograft function. *Lab Invest* 2004;84(3): 353-61.

Hernandez A, Light JA, Barhyte DY, et al. Ablating the ischemia-reperfusion injury in non-heart-beating donor kidneys. *Transplantation* 1999;67(2): 200-6.

Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, et al. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002;74(7): 916-23.

Howie AJ, Ferreira MA, Lipkin GW, et al. Measurement of chronic damage in the donor kidney and graft survival. *Transplantation* 2004;77(7): 1058-65.

Huang C, Huang C, Hestin D, et al. The effect of endothelin antagonists on renal ischaemia-reperfusion injury and the development of acute renal failure in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(9): 1578-85.

Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation* 2001;103(18): 2296-302.

Chapman JR. Longitudinal analysis of chronic allograft nephropathy: clinicopathologic correlations. *Kidney Int Supplement* 2005(99): S108-12.

Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ, et al. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(11): 2967-74.

Irish WD, Ilesley JN, Schnitzler MA, et al. A risk prediction model for delayed graft function in the current era of deceased donor renal transplantation. *Am J Transpl* 2010;10(10): 2279-86.

Jeldres C, Cardinal H, Duclos A, et al. Prediction of delayed graft function after renal transplantation. *Can Urol Assoc J* 2009;3(5): 377-82.

Jevnikar AM, Mannon RB. Late kidney allograft loss: what we know about it, and what we can do about it. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3 Suppl 2: S56-67.

Johnston O, O'Kelly P, Spencer S, et al. Reduced graft function (with or without dialysis) vs immediate graft function--a comparison of long-term renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(8): 2270-4.

Karpinski J, Lajoie G, Cattran D, et al. Outcome of kidney transplantation from high-risk donors is determined by both structure and function. *Transplantation* 1999;67(8): 1162-7.

Kayler LK, Mohanka R, Basu A, et al. Correlation of histologic findings on preimplant biopsy with kidney graft survival. *Transplant Int* 2008;21(9): 892-8.

Kayler LK, Garzon P, Magliocca J, et al. Outcomes and utilization of kidneys from deceased donors with acute kidney injury. *Am J Transpl* 2009;9(2): 367-73.

Kirk AD, Turgeon NA, Iwakoshi NN. B cells and transplantation tolerance. *Nat Rev Nephrol* 2010;6(10): 584-93.

Koning OH, Ploeg RJ, van Bockel JH, et al. Risk factors for delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: a prospective study of renal function and graft survival after preservation with University of Wisconsin solution in multi-organ donors. European Multicenter Study Group. *Transplantation* 1997;63(11): 1620-8.

Koppelstaetter C, Schratzberger G, Perco P, et al. Markers of cellular senescence in zero hour biopsies predict outcome in renal transplantation. *Aging cell* 2008;7(4): 491-7.

Kurian SM, Flechner SM, Kaouk J, et al. Laparoscopic donor nephrectomy gene expression profiling reveals upregulation of stress and ischemia associated genes compared to control kidneys. *Transplantation* 2005;80(8): 1067-71.

Kuypers DR, Chapman JR, O'Connell PJ, et al. Predictors of renal transplant histology at three months. *Transplantation* 1999;67(9): 1222-30.

Lee S, Kim JS, Cho MH, et al. Relationship of renal implantation biopsies and acute rejection during the immediate posttransplantation period. *Transplant Proc* 1998;30(7): 3070-1.

Lechevallier E, Dussol B, Luccioni A, et al. Posttransplantation acute tubular necrosis: risk factors and implications for graft survival. *Am J Kidney Dis* 1998;32(6): 984-91.

Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, et al. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(12): 3278-87.

Lopez M, Clarkson MR, Albin M, et al. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(10): 2844-53.

Louis S, Braudeau C, Giral M, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006;81(3): 398-407.

Louis S, Audrain M, Cantarovich D, et al. Long-term cell monitoring of kidney recipients after an antilymphocyte globulin induction with and without steroids. *Transplantation* 2007;83(6): 712-21.

Lu AD, Desai D, Myers BD, et al. Severe glomerular sclerosis is not associated with poor outcome after kidney transplantation. *Am J Surg* 2000;180(6): 470-4.

Marshall R, Ahsan N, Dhillon S, et al. Adverse effect of donor vasopressor support on immediate and one-year kidney allograft function. *Surgery* 1996;120(4): 663-5; discussion 6.

Mas VR, Archer KJ, Yanek K, et al. Gene expression patterns in deceased donor kidneys developing delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 2008;85(4): 626-35.

Mas VR, Archer KJ, Scian M, et al. Molecular pathways involved in loss of graft function in kidney transplant recipients. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10(3): 269-84.

Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transpl* 2004;4(8): 1289-95.

Mengel M, Sis B. An appeal for zero-time biopsies in renal transplantation. *Am J Transpl* 2008;8(11): 2181-2.



Moore J, Ramakrishna S, Tan K, et al. Identification of the optimal donor quality scoring system and measure of early renal function in kidney transplantation. *Transplantation* 2009;87(4): 578-86.

Mueller TF, Einecke G, Reeve J, et al. Microarray analysis of rejection in human kidney transplants using pathogenesis-based transcript sets. *Am J Transpl* 2007;7(12): 2712-22.

Mueller TF, Reeve J, Jhangri GS, et al. The transcriptome of the implant biopsy identifies donor kidneys at increased risk of delayed graft function. *Am J Transpl* 2008;8(1): 78-85.

Mueller TF, Solez K, Mas V. Assessment of kidney organ quality and prediction of outcome at time of transplantation. *Semin Immunopathol* 2011;33(2): 185-99.

Muller TF, Grebe SO, Reckzeh B, et al. Short- and long-term effects of polyclonal antibodies. *Transplantat Proc* 1999;31(3B Suppl): 12S-5S.

Munivenkatappa RB, Schweitzer EJ, Papadimitriou JC, et al. The Maryland aggregate pathology index: a deceased donor kidney biopsy scoring system for predicting graft failure. *Am J Transpl* 2008;8(11): 2316-24.

Naesens M, Li L, Ying L, et al. Expression of complement components differs between kidney allografts from living and deceased donors. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(8): 1839-51.

Nankivell BJ, Fenton-Lee CA, Kuypers DR, et al. Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation* 2001;71(4): 515-23.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349(24): 2326-33.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, et al. Evolution and pathophysiology of renal-transplant glomerulosclerosis. *Transplantation* 2004;78(3): 461-8.

Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010;120(6): 1836-47.

Nickeleit V. Pathology: donor biopsy evaluation at time of renal grafting. *Nat Rev Nephrol* 2009;5(5): 249-51.

Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, et al. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation* 2004;78(7): 978-86.

Nyberg SL, Matas AJ, Rogers M, et al. Donor scoring system for cadaveric renal transplantation. *Am J Transpl* 2001;1(2): 162-70.

Nyberg SL, Matas AJ, Kremers WK, et al. Improved scoring system to assess adult donors for cadaver renal transplantation. *Am J Transpl* 2003;3(6): 715-21.

Obhrai J, Goldstein DR. The role of toll-like receptors in solid organ transplantation. *Transplantation* 2006;81(4): 497-502.

Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, et al. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63(7): 968-74.

Peeters P, Vanholder R. Therapeutic interventions favorably influencing delayed and slow graft function in kidney transplantation: mission impossible? *Transplantation* 2008;85(7 Suppl): S31-7.

Perco P, Kainz A, Wilflingseder J, et al. Histogenomics: association of gene expression patterns with histological parameters in kidney biopsies. *Transplantation* 2009;87(2): 290-5.

Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364(9447): 1814-27.

Pessione F, Cohen S, Durand D, et al. Multivariate analysis of donor risk factors for graft survival in kidney transplantation. *Transplantation* 2003;75(3): 361-7.

Plata-Munoz JJ, Vazquez-Montes M, Friend PJ, et al. The deceased donor score system in kidney transplants from deceased donors after cardiac death. *Transplant Int* 2010;23(2): 131-9.

Pokorna E, Vitko S, Chadimova M, et al. Proportion of glomerulosclerosis in procurement wedge renal biopsy cannot alone discriminate for acceptance of marginal donors. *Transplantation* 2000;69(1): 36-43.

Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation* 2002;74(9): 1281-6.

Randhawa P. Role of donor kidney biopsies in renal transplantation. *Transplantation* 2001;71(10): 1361-5.

Randhawa PS, Minervini MI, Lombardero M, et al. Biopsy of marginal donor kidneys: correlation of histologic findings with graft dysfunction. *Transplantation* 2000;69(7): 1352-7.

Rangan GK, Wang Y, Tay YC, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats. *Kidney Int* 1999;56(1): 118-34.

Rao PS, Schaubel DE, Guidinger MK, et al. A comprehensive risk quantification score for deceased donor kidneys: the kidney donor risk index. *Transplantation* 2009;88(2): 231-6.

Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, et al. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med* 2006;354(4): 343-52.

Rosen S, Stillman IE. Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(5): 871-5.

Rosengard BR, Feng S, Alfrey EJ, et al. Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor. *Am J Transpl* 2002;2(8): 701-11.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212: 8-27.

Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, et al. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(8): 1254-62.

Sawitzki B, Bushell A, Steger U, et al. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transpl* 2007;7(5): 1091-102.

Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 1996;155(6): 1831-40.

Shoskes DA, Cecka JM. Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation* 1998;66(12): 1697-701.

Shoskes DA, Shahed AR, Kim S. Delayed graft function. Influence on outcome and strategies for prevention. *Urol Clin North Am* 2001;28(4): 721-32.

Scheepstra C, Bemelman FJ, van der Loos C, et al. B cells in cluster or in a scattered pattern do not correlate with clinical outcome of renal allograft rejection. *Transplantation* 2008;86(6): 772-8.

Schilling M, Holzinger F, Friess H, et al. Pathogenesis of delayed kidney graft function: role of endothelin-1, thromboxane B2, and leukotriene B4. *Transplant Proc* 1996;28(1): 304-5.

Schnuelle P, Gottmann U, Koppel H, et al. Comparison of early renal function parameters for the prediction of 5-year graft survival after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(1): 235-45.

Schold JD, Kaplan B, Baliga RS, et al. The broad spectrum of quality in deceased donor kidneys. *Am J Transpl* 2005;5(4 Pt 1): 757-65.

Schold JD, Kaplan B. The elephant in the room: failings of current clinical endpoints in kidney transplantation. *Am J Transpl* 2010;10(5): 1163-6.

Snanoudj R, Rabant M, Timsit MO, et al. Donor-estimated GFR as an appropriate criterion for allocation of ECD kidneys into single or dual kidney transplantation. *Am J Transpl* 2009;9(11): 2542-51.

Snoeijs MG, Buurman WA, Christiaans MH, et al. Histological assessment of preimplantation biopsies may improve selection of kidneys from old donors after cardiac death. *Am J Transpl* 2008;8(9): 1844-51.

Snyder JJ, Kasiske BL, Gilbertson DT, et al. A comparison of transplant outcomes in peritoneal and hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002;62(4): 1423-30.

Sung RS, Christensen LL, Leichtman AB, et al. Determinants of discard of expanded criteria donor kidneys: impact of biopsy and machine perfusion. *Am J Transpl* 2008;8(4): 783-92.

Suri D, Meyer TW. Influence of donor factors on early function of graft kidneys. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(6): 1317-23.

Swanson SJ, Hypolite IO, Agodoa LY, et al. Effect of donor factors on early graft survival in adult cadaveric renal transplantation. *Am J Transpl* 2002;2(1): 68-75.

Tapiawala SN, Tinckam KJ, Cardella CJ, et al. Delayed graft function and the risk for death with a functioning graft. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(1): 153-61.

Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, et al. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med* 1995;333(6): 333-6.

Ugarte R, Kraus E, Montgomery RA, et al. Excellent outcomes after transplantation of deceased donor kidneys with high terminal creatinine and mild pathologic lesions. *Transplantation* 2005;80(6): 794-800.

Verran D, Sheridan A, Barnwell A, et al. Biopsy of potential cadaveric renal allografts at the time of retrieval. *Nephrology* 2005;10(4): 414-7.

Viklicky O, Hribova P, Volk HD, et al. Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(1): 173-80.

Wijnen RM, Booster MH, Stubenitsky BM, et al. Outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Lancet* 1995;345(8957): 1067-70.

Womer KL, Kaplan B. Recent developments in kidney transplantation--a critical assessment. *Am J Transpl* 2009;9(6): 1265-71.

Zarkhin V, Kambham N, Li L, et al. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int* 2008;74(5): 664-73.

## Publikace

### Související s disertační prací:

1. **Wohlfahrtova M**, Brabcova I, Zelezny F, Balaz P, Janousek L, Honsova E, Lodererova A, Wohlfahrt P, Viklicky O. Tubular Atrophy and Low Netrin-1 Gene Expression Are Associated With Delayed Kidney Allograft Function. *Transplantation*, 2014, 27;97(2):176-83. **IF 3.781**
2. Balaz P, Rokosny S, **Wohlfahrtova M**, Wohlfahrt P, Bartonova A, Pokorna E, Honsova E, and Viklicky O. Identification of Expanded Criteria Donor Kidney Grafts at Lower Risk of Delayed Graft Function. *Transplantation*, 2013, 15;96(7):633-8. **IF 3.781**
3. Viklicky O, Krystufkova E, Brabcova I, Sekerkova A, Wohlfahrt P, Hribova P, **Wohlfahrtova M**, Sawitzki B, Slatinska J, Striz I, Volk HD, Reinke P. B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation* 2013 Jan 15;95(1):148-5. **IF 3.781**
4. **Urbanova M**, Brabcova I, Girmanova E, Zelezny F, Viklicky O. Differential regulation of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway by rabbit antithymocyte globulins in kidney transplantation. *Transplantation* 2012 Mar 27;93(6): 589-96. **IF 3.781**
5. **Urbanova M**, Kalousova M, Zima T, Skibova J, Wohlfahrt P, and Viklicky O. Fetuin-A Early after Renal Transplantation. *Kidney Blood Press Res.* 2009; 32(3):217-22. **IF 1.596**

### Ostatní publikace:

1. **Wohlfahrtova M**, Viklicky O. Recent trials in immunosuppression and their consequences for current therapy. *Curr Opin Organ Transplant.* 2014 Aug;19(4):387-94. **IF 2.379**



2. Keddiss MR, Ters ME, Rodrigo E, Dean P, **Wohlfahrtova M**, Kudva YC, Lorenz EC, and Cosio FG. Improving patient survival after kidney transplantation: meeting the challenge of diabetes. *Kidney International*, 2014 Sep;86(3):610-8. **IF 7.916**
3. Balaz P, Rokosny S, Wohlfahrt P, **Wohlfahrtova M**, Adamec M, Janousek L, Fronek J, Viklicky O, Pokorna E. Dual kidney transplant: a single-center experience and review of the literature. *Exp Clin Transplant*, 2013 Oct;11(5):388-95. **IF 0.588**
4. Slatinska J, Rohal T, **Wohlfahrtova M**, and Viklicky O. Long-term Follow-up of Stable Kidney Transplant Recipients After Conversion From Tacrolimus Twice Daily Immediate Release to Tacrolimus Once-daily Prolonged Release: A Large Single-Center Experience. *Transplant Proc.*, 2013 May;45(4):1491-6. **IF 0.952**
5. Girmanova E, Brabcova I, Klema J, Hribova P, **Wohlfahrtova M**, Skibova J, Viklicky O. Molecular networks involved in the immune control of BK polyomavirus. *Clin Dev Immunol*, 2012. **IF 3.064**
6. Řepová B., **Wohlfahrtová M**, Viklický O. Těhotenství po transplantaci ledviny nepředstavuje riziko pro ztrátu štěpu. *Aktuality v nefrologii*, 2013 March, 78-81.
7. Viklicky O, Netuka I, **Urbanova M**, Adamec M, Maly J, Voska L, Pokorna E. Kidney Transplantation from a Brain-dead Heart Transplant Candidate Treated with Biventricular Assist Device: 12-Month Follow-up. *NDT plus*, 2008 1(1):34-35.
8. **Urbanová M**. Diabetes mellitus po transplantaci ledviny in *Transplantace ledviny v klinické praxi*. Viklický O, Adamec M, Baláž P. Grada 2008, Czech Republic.

9. **Urbanová M.** Hematologické komplikace po transplantaci ledviny in Transplantace ledviny v klinické praxi. Viklický O, Adamec M, Baláž P. Grada 2008, Czech Republic.
  
10. Mráz M, **Urbanová M**, Wohlfahrt P, Podracká L. Mozgový nátriuretický peptid (BNP) a kardiovaskulárne riziko v detskom veku. Čes.-slov. Pediat. 2006;61(2): 89-94.

## Přílohy

**Tabulka 1.** Rizikové faktory DGF

<p><b>Dárce</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Zvýšený S-Cr</li><li>• Vyšší věk</li><li>• Vyšší hmotnost</li><li>• Anamnéza hypertenze, DM</li><li>• Anoxická nebo cerebrovaskulární příčina smrti</li><li>• Dárce s nebijícím srdcem</li><li>• Inotropní podpora dárce</li></ul> <p><b>Příjemce</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Mužské pohlaví</li><li>• Afroamerická rasa</li><li>• Diabetes mellitus</li><li>• Dlouhá doba na dialýze</li><li>• Vyšší BMI</li><li>• „Křehkost“ příjemce</li><li>• Vyšší max. PRA</li><li>• Retransplantace</li><li>• Anamnéza transfuzí</li><li>• Předtransplantační sérová hladina fosforu</li><li>• Hypovolémie příjemce</li><li>• HD s UF 24 hodin před Tx</li><li>• Způsob dialýzy (HD vs. PD)</li></ul> <p><b>Odběr orgánu</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Dlouhá doba studené ischemie</li><li>• Teplá ischemie</li><li>• Prezervace orgánu (jednoduchá vs. pulzatilní)</li></ul> <p><b>Transplantace</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• CNI nefrotoxicita</li><li>• Akutní rejekce</li><li>• Chirurgické komplikace Tx (krvácení, trombóza, močový leak, stenóza)</li></ul>
---

**Pozn.:** BMI; body mass index; DGF, opožděný rozvoj funkce štěpu; HD, hemodialýza; PD, peritoneální dialýza; PRA, panel reaktivní protilátky; S-Cr, sérový kreatinin; UF, ultrafiltrace.  
Přebráno a adaptováno z Irish et al., *Am J Transplant*, 2010 (Irish et al., 2010).

**Tabulka 2.** Studie na predikci DGF a funkci štěpu založené na histopatologickém skóre

v biopsii tzv. nulté hodiny

Reference	Sledování (měs.)	Zjištění
(Gaber et al., 1995)	2	GS souvisí s ↑ DGF, Cr, ztrátou štěpu
(Wijnen et al., 1995)	36	GS nesouvisí s přežitím štěpu
(Lee et al., 1998)	1	Bioptické nálezy souvisí s rejekcí
(Kuypers et al., 1999)	3	Implantační biopsie úzce souvisí s 3měsíční biopsii
(Karpinski et al., 1999)	18	Cévní poškození je spojeno s ↑ DGF, rejekcí a Cr
(Eapen et al., 2000)		Bioptické nálezy souvisí s ↑ rejekcí
(Bosmans et al., 2000)	18	cv je spojen s výsledkem Tx, narozdíl od IF a GS
(Lu et al., 2000)	24	GS není spojena s DGF a horším přežitím
(Randhawa et al., 2000)	12	GF a IF úzce souvisí s funkcí štěpu
(Pokorna et al., 2000)	24	Věk dárce na rozdíl od GS úzce souvisí s krátkodobou a dlouhodobou funkcí štěpu
(Nankivell et al., 2001)	12	IF a cévní poškození je spojeno s CAN
(Nankivell et al., 2003)	84	ATN je spojeno s ↑ CAN a cv
(Escofet et al., 2003)	44	GS je spojená s ↓ funkcí
(Howie et al., 2004)	168	Závažná GS je spojená s ↓↓ přežitím štěpu
(Nankivell et al., 2004)	84	GS a periglomerulární fibróza je spojena s ↓eGFR
(Edwards et al., 2004)	24	eGFR na rozdíl od GS souvisí s funkcí a přežitím štěpu v 1 roce
(Cosio et al., 2005)	33	Pretransplantační poškození je spojeno s IF

(Cicciarelli et al., 2005)		GS je spojena s ↓ funkcí štěpu a ↑ DGF
(Verran et al., 2005)		GS nesouvisí s 1 ročním přežitím štěpu
(Cosio et al., 2005)	33	IF je spojena s přežitím štěpu
(Ugarte et al., 2005)	30	Bioptické nálezy souvisí s ↓eGFR
(Chapman2005)	12	↑ TI změny a GS souvisí s ↓eGFR
(Remuzzi et al., 2006)	23	Bioptické nálezy u starších pacientů souvisí s dlouhodobou funkcí štěpu
(Bajwa et al., 2007)	12	GS nesouvisí s funkcí štěpu
(Sung et al., 2008)	12	Bioptické nálezy a GS jsou spojeny s odmítnutím orgánů, ale ne s výsledky Tx
(Anglicheau et al., 2008)	12	Dárcovské kompozitní skóre (Cr, HT, GS) je spojeno s nízkou eGFR
(Munivenkatappa et al., 2008)	38	Kompozitní skóre MAPI je spojeno s 5 ročním přežitím štěpů
(Kayler et al., 2008)	12	GS a cévní poškození dárce je spojeno s přežitím štěpů

**Pozn.:** CAN (chronic allograft nephropathy), chronická nefropatie štěpu - termín již nyní v Banffské klasifikaci nepoužíván; Cr, kreatinin; cv, fibrózní ztluštění intimy; DGF (delayed graft function), opožděný rozvoj funkce štěpu; eGFR, odhadnutá glomerulární filtrace; GS, glomeruloskleróza; IF, intersticiální fibróza; TI, tubulointersticiální; HT, hypertenze.

**Tabulka 3.** Studie na predikci DGF a funkci štěpu založené na klinických parametrech dárce a příjemce

Reference	Sledování (měs.)	Zjištění
(Ojo et al., 1997)	60	DGF je spojeno s ↓ přežitím štěpu
(Shoskes et al., 1998)	36	DGF je spojeno s ↓ přežitím štěpu
(Lechevallier et al., 1998)	40	DGF je spojeno s ↑ váhou, věkem, CIT a ATS
(Suri et al., 1999)	6	Faktory dárce určují 35-40% časné hodnoty Cr příjemce
(Karpinski et al., 1999)	12	Dárcovský C <sub>1</sub> Cr a cévní patologie korelují s výsledkem Tx
(Nyberg et al., 2001)	1	Příčina úmrtí dárce, HT, C <sub>1</sub> Cr, věk, DM, CIT jsou spojené s krátkodobým přežíváním štěpu
(Swanson et al., 2002)	22	Dárce afroamerické rasy a poměr věku dárce a příjemce jsou spojeny se ztrátou štěpu
(Port et al., 2002)	36	Věk dárce, CMP, ↑ Cr, HT souvisí se ztrátou štěpu
(Irish et al., 2003)		Rizikové skóre založené na 16 faktorech dárce a příjemce predikuje DGF
(Pessione et al., 2003)	25	Faktory dárce (CMP, HT a ↑Cr) jsou spojené s přežitím štěpu



(Nyberg et al., 2003)	72	Příčina úmrtí dárce, HT, ClCr, věk, jsou spojené s výsledkem Tx
(Edwards et al., 2004)	12	ClCr dárce ale ne GS jsou spojené s 1 ročním přežíváním a funkcí štěpu
(Schold et al., 2005)	60	Věk dárce, ↑ Cr, CIT jsou hlavní rizikové faktory
(Johnston et al., 2006)	60	Poměr poklesu Cr do 7. POD je spojené s funkcí štěpu
(El-Husseini et al., 2007)		Rizikové skóre (Irish et al., 2003) není spojeno s DGF u individuálního pacienta
(Schnuelle et al., 2007)	60	Diuréza, Cr v 7. POD předpovídá 5-leté přežití štěpu
(Akl et al., 2008)	60	Neurální síť založená na 11ti faktorech předpovídá 5-leté přežití štěpu
(Kayler et al., 2009)		↑Cr dárce je rizikový faktor pro odmítnutí orgánu k Tx ale ne pro dlouhodobý výsledek Tx
(Moore et al., 2009)	44	Rizikové skóre (Schold et al., 2005) je spojeno s časnou funkcí ale ne s Cr v 6. a 12. měsíci
(Jeldres et al., 2009)		Váha a PRA příjemce, věk dárce, CIT a neshoda v HLA-DR předpovídá DGF
(Plata-Munoz et al., 2010)	12	Rizikové skóre (Plata-Munoz et al., 2010) je spojeno s DGF, Cr ve 3. a 12. měsíci

(Snanoudj et al., 2009)	351	eGFR dárce umožňuje vyšetření ECD ledvin
(Tapiawala et al., 2010)	36	DGF je spojeno s ↑ rizikem úmrtí

**Pozn.:** ATS, ateroskleróza; CIT, studená ischemie, ClCr, clearance kreatininu; CMP, cévní mozková příhoda; Cr, kreatinin; DGF, opožděný rozvoj funkce štěpu; DM, diabetes mellitus; ECD, dárce s rozšířenými kritérii; HT, hypertenze; GS, glomeruloskleróza; POD, pooperační den; Tx, transplantace