

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



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

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

**MUDr. Mariana Wohlfahrtová**

Praha, 2014

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

### **Obor**

Fyziologie a patofyziologie člověka

### **Předseda oborové rady**

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

### **Školící pracoviště**

Klinika nefrologie, IKEM, Praha

### **Školitel**

Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| ABSTRAKT.....   | 4  |
| ABSTRACT.....   | 5  |
| 1. ÚVOD.....  | 6  |
| 2. HYPOTÉZA.....  | 7  |
| 3. CÍL PRÁCE.....   | 7  |
| 4. MATERIÁL A METODIKA.....   | 8  |
| 5. VLASTNÍ VÝSLEDKY VÝZKUMNÉ PRÁCE.....   | 9  |
| 5.1 Molekulární profil ischemicko/reperfuze poškození a identifikace prediktorů<br>opožděného rozvoje funkce štěpu.....     | 9  |
| 5.2 Identifikace ledvin od dárců s rozšířenými kritérii v riziku opožděného rozvoje<br>funkce štěpu.....                    | 10 |
| 5.3 Intrarenální exprese genů po indukční léčbě antithymocytárním globulinem a vliv<br>opožděného rozvoje funkce štěpu..... | 11 |
| 5.4 Predikce akutní rejekce po transplantaci ledviny vyšetřením exprese tolerantních<br>genů v periferní krvi.....          | 12 |
| 6. SOUHRNÁ DISKUSE.....   | 13 |
| 7. ZÁVĚRY.....  | 16 |
| 8. CONCLUSIONS.....   | 17 |
| LITERATURA.....   | 18 |
| PUBLIKACE.....  | 19 |

## **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.

## **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.

## 1. Úvod

I přes snížení výskytu akutních rejekcí nedošlo u transplantací ledvin v posledních dvaceti letech ke zlepšení výsledků (Jevnikar et al., 2008). 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. Hypotéza

Ke zlepšení dlouhodobých výsledků transplantací ledvin je potřebné identifikovat pacienty v riziku opožděného rozvoje funkce štěpu a rejeckce, 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. Předpokládame, že integrovaným genomicko-klinicko-histopatologickým přístupem dokážeme lépe zhodnotit kvalitu orgánu, předpovědět rozvoj funkce a osud štěpu v době transplantace.

## 3. 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.

## 4. Materiál a metodika

### 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{g}$  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  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  metody pro relativní kvantifikaci (RQ, z angl. relative quantity), která je implementovaná 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.

## 5. Vlastní výsledky výzkumné práce

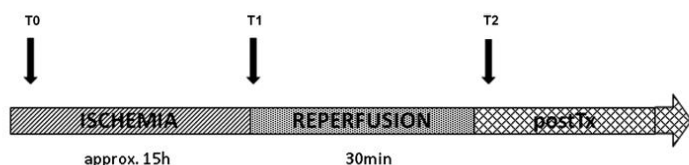
### 5.1 Molekulární profil ischemicko/reperfuzního poškození a identifikace prediktorů opožděného rozvoje funkce štěpu

#### 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. 1). Pomocí metody kvantitativní real-time RT-PCR ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) jsme měřili expresi 92 kandidátních genů ve štěpech ledviny s okamžitým ( $n=26$ ) a opožděným ( $n=9$ ) rozvojem funkce štěpu.



**Obr. 1. 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 multivariátní 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).

## **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.

## **5.2 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 ztluštění arteriol (AH), fibrózní ztluštění 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 ztluštění 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. U ledvin s CIV skóre  $\geq 1$  od dárce staršího 51 let a s anoxickým poškozením mozku bylo riziko DGF nejvyšší. Naopak, ECD dárci 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%).

## **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.

## **5.3 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.

### **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. Domníváme 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.

#### **5.4 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. Exprese 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. 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 (TOR1D) byl upregulován u pacientů s rejekcí. Podobný trend jsme zaznamenali i při porovnání pacientů s hraničními změnami.

##### **Závěr**

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

## 6. Souhrná diskuse

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 nálezn 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 aloimunitní 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 tolerantních 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.

## 7. 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 nálezn 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, ukážou prospektivní intervenční studie založené na monitoraci biologických ukazatelů.



## 8. 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

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

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.