Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Eva Girmanová

BK VIROVÁ INFEKCE U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI LEDVINY

BK VIRUS INFECTION IN KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Praha, 2019

Děkuji svému školiteli Prof. MUDr. Ondřeji Viklickému, CSc. za odborné vedení, za jeho rady, připomínky a vstřícnost, se kterou se mi věnoval při zpracování této práce.

Poděkování patří všem kolegyním z Transplantační laboratoře IKEM, zejména Ing. Ireně Týcové, Ph.D., Ing. Petře Hrubé, Ph.D., Ing. Petře Hřibové, Ph.D. a Romaně Poláčkové za jejich pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Ráda bych také poděkovala všem spolupracujícím sestrám a lékařům z Kliniky nefrologie Institutu klinické a experimentální medicíny za pomoc při sběru vzorků od pacientů.

A nakonec poděkování největší - mé rodině - manželovi Peterovi, našim dětem Lukášovi, Tomášovi a Anetce, za jejich pochopení a trpělivost.

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 své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1.11.2019

Eva Girmanová

Podpis:

Identifikační záznam:

GIRMANOVÁ, Eva. *BK virová infekce u pacientů po transplantaci ledviny. [BK virus infection in kidney transplant patients].* Praha, 2019. Počet stran 77, počet příloh 3. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Institut klinické a experimentální medicíny. Vedoucí závěrečné práce Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

SEZNAM ZKRATEK

ACR	akutní rejekce
ANOVA	analýza rozptylu
AST	American Society of Transplantation
ATG	antithymocytární globulin
AZA	azathioprin
BKV	BK virus
BKVN	BK virová nefropatie
BMI	body mass index
CD	diferenciační sklupina
CIT	doba studené ischemie
CMV	cytomegalovirus
CNI	kalcineurinový inhibitor
CsA	cyklosporin A
Ct	treshold cycle
C4d	depozita C4 složky komplementu
D/R	dárce/příjemce
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DM	diabetes mellitus
dsDNA	dvouvláknová DNA
EBV	virus Epstein-Barrové
eGFR	odhadovaná glomerulární filtrace
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
FCF	fully coupled flux
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HLA	hlavní histokompatibilní systém
HHV	lidský herpesvirus
HIV	lidský virus imunitní nedostatečnosti
HSV	herpes simplex virus
HTLV	lidský T-lymfotropní virus

HPV	lidský papillomavirus
ICAM	intracelulární adhezní molekula
IFN-γ	interferon gamma
IFTA	intersticiální fibróza a tubulární atrofie
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IKEM	Institut Klinické a Experimentální Medicíny
IL	interleukin
IVIG	intravenózní imunoglobuliny
JCV	John Cunningham virus
KIR	killer-cell immunoglobulin like receptor
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KN	klinika nefrologie
MMF	mykofenolát mofetil
mTOR	mammalian target of rapamycin
NCCR	noncoding control region
NK buňky	natural killer buňky (přirození zabíječi)
LTAg	velký tumorový antigen
OPTN	Organ Procurement and Transplantation Network
P	prednison
PCR	polymerázová řetězová reakce
PRA	panel reaktive antibody
PyVAN	polyomavirová nefropatie
qPCR	kvantitativní PCR
RNA	ribonukleová kyselina
ROC	receiver operating characteristic
RSV	respirační synciální virus
RT-qPCR	real time quantitative PCR
STAg	malý tumorový antigen
SV-40	simian virus 40
Tac	takrolimus
TLDA	Taqman Low Density Array
TLR3	Toll-like receptor 3
TNF-α	tumor nekrotizující faktor α

trunTAg	truncated tumor antigen
Tx	transplantace
VP	virový protein
VZV	varicella zoster virus
WNV	West nile virus

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK 5

OBSAH 8

1 ABSTRAKT 9

2 ABSTRACT 10

3 ÚVOD 11

3.1 Transplantace ledvin 11

3.2 Imunosupresivní léčba po transplantaci ledviny a její komplikace 11

3.3 Infekční komplikace po transplantaci ledviny 12

3.4 Virové infekce po transplantaci ledviny 13

4 BK POLYOMAVIRUS 14

4.1 Prevalence a způsob přenosu 14

4.2 Struktura viru 15

4.3 Organizace genomu, transkripce a replikace 16

4.4 Pohyb buňkou 18

5 BK VIROVÁ NEFROPATIE 20

5.1 Rizikové faktory BKVN 20

5.2 Diagnóza BKVN 23

5.3 Imunitní odpověď při BKV infekci a BKVN 27

5.4 Léčba BKVN 29

5.5 Retransplantace u pacientů po BKVN 31

6 CÍLE PRÁCE 33

7 MONITOROVACÍ STUDIE 34

7.1 Metodika 34

7.2 Výsledky 37

7.3 Diskuse 42

8 STUDIE GENOVÉ EXPRESE 45

8.1 Metodika 45

8.2 Výsledky 50

8.3 Diskuse 55

9 OBSERVAČNÍ STUDIE 57

9.1 Metodika 57

9.2 Výsledky 59

9.3 Diskuse 64

10 ZÁVĚR 66

11 LITERATURA 68

13 PŘÍLOHY PUBLIKACÍ 78

A prospective longitudinal study of BK virus infection in 120 czech renal transplant recipients 79

Molecular network involved in the immune control of BK polyomavirus 80

BK virová infekce po transplantaci ledvin 81

1 ABSTRAKT

BK virus je příčinou vzniku BK virové nefropatie (BKVN) u 1-10 % pacientů po transplantaci ledviny. U zhruba 30-80 % pacientů po transplantaci ledviny dochází k bezpříznakové reaktivaci BK viru, která nevede k rozvoji BK virové nefropatie.

Prvním cílem této studie bylo provést monitoraci replikace BK viru v krvi a moči u pacientů v prvním roce po transplantaci ledviny. Byly zhodnoceny rizikové faktory a stanoveny hraniční hodnoty viremie a virurie pro rozvoj BKVN. Pozitivní BK virurie $>10^7$ kopií/ml a pozitivní BK viremie $>10^4$ kopií/ml se vyskytla u 25,8 %, resp. 5 % pacientů. U tří pacientů z monitorovací studie došlo k rozvoji BKVN. Pomocí ROC analýzy byly stanoveny hraniční hodnoty pro rozvoj BKVN na 10^3 kopií/ml séra pro BK viremii a $6{,}7\times10^7$ kopií/ml moči pro BK virurii.

Druhým cílem bylo stanovit expresní profil imunitních genů v biopsiích ledvin u tří skupin pacientů (pacienti s bezpříznakovou virurií, pacienti s BKVN, kontrolní skupina bez reaktivace viru). Bylo měřeno 90 genů imunitní odpovědi metodou TaqMan® low density array RT-qPCR. Pacienti s bezpříznakovou virurií měli 5 rozdílně exprimovaných genů (CD3E, CD68, CCR2, ICAM-1, SKI; $p<0{,}05$) oproti kontrolní skupině. Pacienti s rozvinutou BKVN vykazovali odlišnou expresi 33 z 90 měřených genů oproti kontrolní skupině.

Třetím cílem práce bylo zhodnotit incidenci, rizikové faktory a dlouhodobé výsledky pacientů s významnou BK viremií a biopticky ověřenou BK virovou nefropatií v letech 2009 až 2018.

Incidence BKVN se u našich pacientů pohybovala v rozmezí 3,5-6,4 % dle roku transplantace. Věk dárce, věk příjemce, doba na dialýze, doba studené ischemie ani typ a pořadí transplantace nebyly rizikovými faktory pro vznik BKV infekce a BKVN ($p>0{,}05$). Přežití štěpů cenzorované na úmrtí bylo významně horší jak u pacientů s BK viremií $>10^4$, tak i u pacientů s BKVN. Porovnání mezi BKVN pacienty se selhaným/neselhaným štěpem ukázalo, že u skupiny pacientů se selhaným štěpem byl vyšší podíl pacientů s: vyšší hladinou sérového kreatininu v době diagnózy BKVN, vyšší BK viremií v době diagnózy, dárci ženského pohlaví.

Klíčová slova: BK virus, BKVN, transplantace ledviny, genová exprese

2 ABSTRACT

Polyoma BK virus is associated with graft dysfunction leading to BK viral nephropathy (BKVN) in 1-10 % of kidney transplant recipients. Moreover about 30-80 % of kidney transplant recipients experience asymptomatic reactivation of the virus that does not result in BKV associated nephropathy of the renal allograft.

The first aim of this study was to monitor BK virus replication in the blood and urine of patients within first year after transplantation. Risk factors were evaluated and limit values for viremia and viruria for BKVN development were established. Positive BK viruria $>10^7$ copies/ml and positive BK viremia $>10^4$ copies/ml occurred in 25.8 % and 5 %; respectively. 3 patients out of monitoring study developed BKVN. Using ROC analysis, limit values for the development of BKVN were set at 10^3 copies/ml serum for BK viremia and $6.7x10^7$ copies/ml BK viruria.

The second aim was to determine the expression profile of immune genes in kidney biopsies in three groups of patients with varying degrees of BK virus reactivation (without virus reactivation, with asymptomatic viruria, BKVN). 90 genes of immune response were measured by the TaqMan® low density array RT-qPCR. The analysis of biopsies from patients with non-signalling viruses led to the identification of 5 differentially expressed genes (CD3E, CD68, CCR2, ICAM-1, SKI, $p<0.05$). Compared with the control group, the BKVN group showed a different expression of 33 of the 90 genes measured. The third aim was to evaluate incidence, risk factors and treatment outcome in patients with BK polyomavirus nephropathy (BKVN) diagnosis between 2009 and 2018. The incidence of BKVN in our patients ranged from 3.5-6.4 % according to the year of transplantation. Donor age, recipient age, dialysis time, cold ischemia time, and type and order of transplantation were not risk factors for high BK viremia and BKVN ($p>0.05$). The survival of death-censored grafts was significantly worse in both BK viremia $>10^4$ and BKVN patients. Comparison between BKVN patients with failed/non-failed grafts showed that the proportion of patients with higher serum creatinine at the time of diagnosis of BKVN, higher BK viremia at the time of diagnosis and female donors was higher in the failed graft group.

Key words: BK virus, BKVN, kidney transplantation, gene expression

3 ÚVOD

BK polyomavirus je původcem běžných dětských infekcí. Po primoinfekci perzistuje v renálních tubulárních buňkách a v uroepitelu, kde běžně nepůsobí komplikace. U imunosuprimovaných pacientů po transplantaci ledviny může být příčinou závažných komplikací, nejčastěji ve formě BK virové nefropatie (Novotná & Viklický, 2008). Tento základní přehled popisuje transplantaci ledviny a její komplikace, vlastnosti BK viru a BK virovou nefropatii.

3.1 Transplantace ledvin

První úspěšná transplantace (Tx) ledviny byla v IKEM provedena v roce 1966, kdy byla pacientu Karlu Pavlíkovi transplantována ledvina od jeho matky (Viklický, Janoušek, & Baláž, 2008). Dnes žije v České republice asi 4500 pacientů s transplantovanou ledvinou a každý rok je provedeno zhruba 500 nových Tx ledviny (z nichž více než polovina je prováděna v IKEM). Krátkodobé výsledky transplantací jsou výborné, jednoroční přežívání štěpů ledvin dosahuje 95 %. Hlavní překážky zlepšení dlouhodobého přežívání štěpů se ale v posledních letech nedaří překonat a pouze 50-70 % transplantovaných ledvin je funkčních po 10 letech (Tong et al., 2016). Horší dlouhodobé výsledky transplantací jsou ovlivněny na jedné straně přítomností chronické rejekce, na druhé straně komplikacemi dlouhodobé imunosupresivní léčby (Viklický, 2010).

3.2 Imunosupresivní léčba po transplantaci ledviny a její komplikace

Imunosupresivní léčba chrání orgán proti odhojení imunitním systémem příjemce. Pro přijetí a správné fungování transplantovaného orgánu musí pacient užívat imunosupresivní léky po celou dobu, kdy je štěp funkční (Burgelová, 2011).

Běžná imunosupresiva snižují počet imunitních buněk, redukují produkci cytokinů, deaktivují T lymfocyty, mění migraci a proliferaci lymfocytů a dalších imunokompetentních buněk. Typický pacient po transplantaci ledviny dostává před a během transplantace indukční imunosupresivní léčbu a následnou udržovací imunosupresivní léčbu. V případě rejekce pak antirejekční léčbu (Viklický, 2010).

Indukční imunosupresivní režim je používán k intenzivní imunosupresi bezprostředně před a během prvních dnů po transplantaci. Jeho cílem je zabránit rejekci štěpu v období, kdy je imunitní odpověď na aloantigen nejintenzivnější. Všichni pacienti obdrží methylprednisolon. Dále se k indukci využívají protilátky polyklonální (např. antithymocytární imunoglobulin) a monoklonální (např. anti CD25-basiliximab), které eliminují efektorové T-lymfocyty nebo blokují jejich funkci (Burgelová, 2011).

Udržovací imunosupresivní režim se skládá většinou z trojkombinace léčiv, která zahrnuje inhibitor kalcineurinu (cyklosporin A, takrolimus), inhibitor syntézy purinů mofetil-mykofenolát a kortikosteroidy, alternativou jsou inhibitory mTOR (sirolimus, everolimus) (Viklický, 2010).

Antirejekční léčba je nárazová a používá se k potlačení vzniklé rejekce. V případě celulární rejekce jsou podávány pulzní dávky steroidů a v případě neúspěchu této léčby nebo v případě těžkého poškození štěpu pak antithymocytární imunoglobulin. Humorální rejekce se léčí plazmaferézami a intravenózními imunoglobuliny (IVIG), v poslední době se též využívá anti-CD20 monoklonální protilátka. Dlouhodobá imunosuprese je zatížena výskytem mnoha vedlejších účinků, jakými jsou infekce, kardiovaskulární komplikace, nefrotoxicita a nezanedbatelné riziko vzniku malignit (Halloran, 2004; Viklický, 2010).

3.3 Infekční komplikace po transplantaci ledviny

Doživotní imunosuprese je spojena s vysokým rizikem infekčních komplikací. Ty jsou nejčastější příčinou morbidity a mortality po transplantaci. Výskyt infekčních komplikací se tradičně dělí podle časové osy na 3 období, časné (1. měsíc po Tx ledviny), střední (2.-6. měsíc po Tx ledviny) a pozdní (déle než 6 měsíců po Tx ledviny) (Karuthu & Blumberg, 2012).

V **časném období** (do 4 týdnů po Tx ledviny) je výskyt infekčních komplikací podobný jako u jiných pacientů po chirurgickém výkonu. Z bakteriálních infekcí se jedná nejčastěji o infekce močového traktu, záněty plic, infekce v oblasti chirurgické rány a septické stavy. Z virů se v prvních 4 týdnech mohou reaktivovat herpetické viry HSV-1 a HSV-2. Chirurgické komplikace (lymfokéla, hematomy, leak z oblasti ureterální anastomózy), přítomnost akutní rejekce nebo dysfunkce štěpu dále zvyšují riziko výskytu infekcí.

Mezi **2. a 6. měsícem** po transplantaci jsou nejčastější oportunní infekce. Z bakteriálních původců infekcí se jedná nejčastěji o clostridium difficile, nocardie, listerie, ale i mykobaktérie. Z virových původců jde zejména o cytomegalovirus (CMV), polyoma BK virus, EBV, ostatní herpetické viry a adenoviry. Nezanedbatelný podíl tvoří infekce mykotické.

Pozdní **výskyt infekcí po 6. měsíci** od transplantace často souvisí s funkcí štěpu. Výskyt infekcí u této skupiny je obdobný jako u zdravé populace. Rizikovou skupinou jsou pacienti s nefunkčními štěpy, pacienti s opakovanými epizodami akutních rejekcí či chronickou rejekcí, u kterých dochází většinou k intenzifikaci imunosupresivní terapie (Fishman, 2009; Viklický, 2010).

3.4 Virové infekce po transplantaci ledviny

Oportunní virové infekce se nejčastěji objevují mezi 1. a 6. měsícem po transplantaci, kdy dochází k nejintenzivnější imunosupresi (Viklický, 2010). Tabulka 1 uvádí přehled původců nejčastějších virových infekcí po Tx ledviny.

Tabulka 1. Nejčastější původci virových infekcí po transplantaci ledviny.
Převzato z (Ethem, Ahmet, Muhammed Taha, & Omer Faruk, 2018)

Patogen
Herpes simplex virus (HSV)
Varicella zoster virus (VZV)
Epstein-Barr virus (EBV)
Cytomegalovirus (CMV)
Human herpes virus 6,7,8 (HHV)
Human T-lymphotropic virus 1 a 2 (HTLV)
Human papillomavirus (HPV)
Parvovirus B19
Polyomavirus BK/JC
Adenovirus
Respiratory syncial virus (RSV)
Coronavirus
Hepatitis B virus, Hepatitis C virus (HBV, HCV)
West nile virus (WNV)
Influenza and parainfluenza viruses
Rabies virus
Rhinovirus

4 BK POLYOMAVIRUS

BK virus (BKV) patří do čeledi *Polyomaviridae*. Doposud bylo popsáno více než 70 druhů polyomavirů, schopných infikovat minimálně 8 druhů savců (Feltkamp, Kazem, van der Meijden, Lauber, & Gorbalenya, 2013). Polyomaviry jsou dle Baltimorovy klasifikace řazeny do skupiny I. (viry s dvouvláknovou DNA) a jsou dle aminokyselinové sekvence velkého LTag děleny do 4 rodů, BK virus náleží k rodu Betapolyomavirus (Moens et al., 2017). Infekce BK virem byla poprvé popsána u pacienta s ureterální stenózou v roce 1971. Virus byl označen písmeny BK dle iniciálů tohoto 39letého súdánského pacienta (Gardner, Field, Coleman, & Hulme, 1971).

4.1 Prevalence a způsob přenosu

BKV nemá zvířecího hostitele, k přenosu dochází pouze z člověka na člověka (Moriyama & Sorokin, 2009). Popsán byl přenos vzdušnou cestou, orofekální přenos a znám je i transplacentální přenos z matky na plod (Ambalathingal, Francis, Smyth, Smith, & Khanna, 2017).

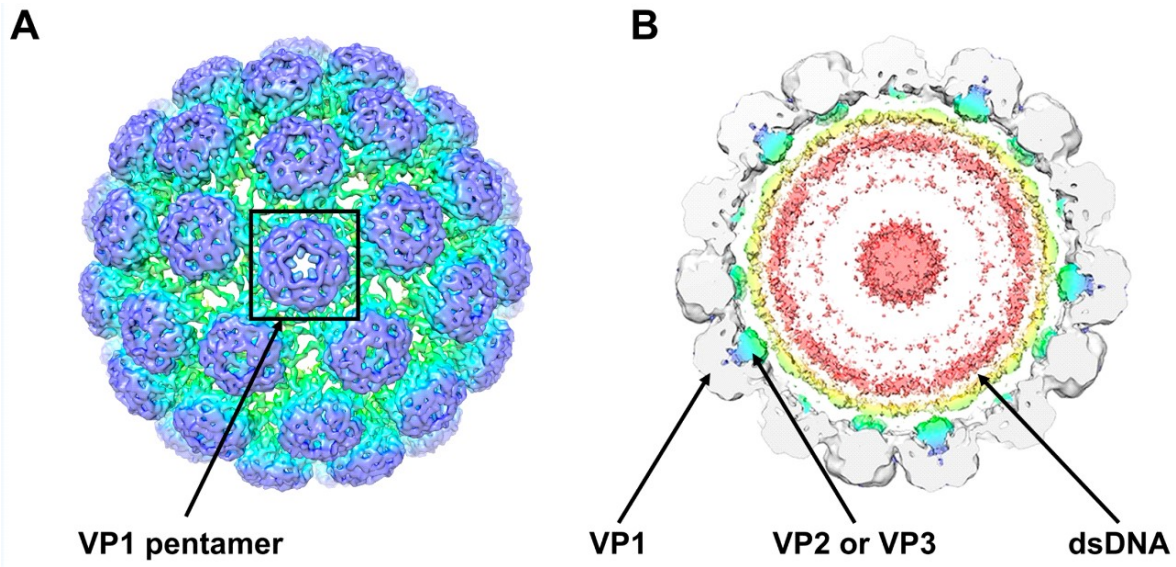
Přibližně u 80-90 % běžné populace je možno detekovat protilátky proti BKV. K primární infekci dochází v dětství. Primoinfekce BKV v dětství se projevuje jako infekce horních cest dýchacích, ojediněle se vyskytuje s akutní cystitidou a hematurií. Ve 3 letech má 50 % dětí detekovatelné protilátky proti BKV a v 10 letech již většina (Knowles, 2006). Předpokládá se, že primární infekce probíhá v mandlích a z nich se pak virus šíří infikovanými monocyty do dalších orgánů. Virus se stává latentním a přežívá zejména v urinárním epitelu (Dall & Hariharan, 2008). Přítomnost BKV sekvencí byla popsána i v mnoha dalších orgánech a tkáních (krev, mozek, játra, žaludek, genitálie, semeno, pokožka, lymfatické uzliny) (Abend, Jiang, & Imperiale, 2009). K reaktivaci a nízkému stupni replikace s bezpříznakovou virurií dochází u zhruba 5 % zdravé populace (Hans H Hirsch, 2005).

Reaktivace BKV byla kromě pacientů po transplantaci ledviny popsána u pacientů po Tx hematopoetických kmenových buněk, u ostatních nerenálních transplantací solidních orgánů, u pacientů s HIV, u pacientů s lupus erythematodes, u Wiskottova-Aldrichova

syndromu, u imunodeficience s hyper-IgM, u Hodgkinovy choroby a u pacientů s roztroušenou sklerózou, léčených natalizumabem (Lamarche et al., 2016).

4.2 Struktura viru

BKV je neobalený virus, T=7d ikozaedrálního tvaru, o velikosti 40 až 44 nm. Vnější obal polyomavirové kapsidy se skládá z 360 molekul hlavního kapsidového proteinu VP1, organizovaných do 72 vyčnívajících kapsomer. 12 kapsomer je pentavalentních a 60 hexavalentních. Každý pentamer VP1 je spojen s jedinou kopií vedlejšího konstrukčního proteinu VP2 nebo VP3. VP1 je jediným VP exponovaným na vnějším obalu virionu a jsou v něm malé rýhy, které interagují s hostitelskými celulárními receptory. VP2 a VP3 jsou namířeny dovnitř virionu a pomáhají stabilizaci virové částice mimo hostitelskou buňku a při změně struktury kapsidy během vstupu do buňky (De Gascun & Carr, 2013). Celá struktura je stabilizována pomocí intra a inter pentamerických disulfidických vazeb a Ca^{2+} kationtů. Vyčnívající C-konce hlavních kapsidových proteinů VP1 umožnují spojení sousedních pentamer. V roce 2016 byl publikován obrázek struktury nativního infekčního BKV virionu, získaný pomocí kryo-elektronové mikroskopie (Obrázek 1.) (Hurdiss et al., 2016).



Obrázek 1. Struktura BK viru. Zobrazení struktury BK viru pomocí kryo-elektronové mikroskopie. (A) Vnější pohled na virion. V rámečku je zvýrazněn pentametr z VP1 proteinů. (B) Znázornění organizace dsDNA genomu BK viru. Pohled na vzorek o tloušťce 40 Å. Převzato z (Helle et al., 2017).

4.3 Organizace genomu, transkripce a replikace

Genom BKV (Obrázek 2.) představuje cirkulární dvoušroubovicová molekula DNA obsahující 5300 párů bazí. Genomová architektura BKV je stálá a skládá se ze tří regionů: tzv. nekódujícího kontrolního regionu (NCCR), regionu časných genů a regionu pozdních genů.

NCCR je hypervariabilní region, na kterém jsou umístěna vazebná místa pro buněčné regulační faktory (Ambalathingal et al., 2017). NCCR kontroluje virovou replikaci a transkripci, zahrnuje oblast replikace, transkripční promotorový region a zesilovač transkripce. V regionu časných genů jsou kódovány „malý tumorový antigen" (STAg), „velký tumorový antigen" (LTAg) a „zkrácený TAg" (truncTAg), které jsou exprimovány alternativně sestřiženými mRNA brzy po infekci hostitelské buňky (Helle et al., 2017; Hans H Hirsch, 2005).

V regionu pozdních genů jsou kódovány tři strukturální kapsidové proteiny, virový protein 1 (VP1), VP2, VP3 a nestrukturální agnoprotein. U BKV se předpokládá i existence VP4 (viroporin). V regionu pozdních genů je kódována i virová miRNA, která obsahuje sekvence komplementární k rané oblasti mRNA kódující velký tumorový antigen a malý tumorový antigen (Daniels, Sadowicz, & Hebert, 2007; Henriksen, Hansen, Bruun, & Rinaldo, 2016).

Pro transkripci jsou využívány oba řetězce DNA. K transkripci nejprve dochází na jednom vlákně DNA, v jednom směru. Tato transkripce vede k tvorbě mRNA kódující časné geny LTAg, STAg. Polyomavirová replikace je zásadně závislá na buněčných faktorech hostitelské buňky (Moens et al., 2017). LTAg je multifunkčním regulátorem polyomavirové transkripce a replikace. Otevřený čtecí rámec je umístěn uprostřed genomu, replikace tak může probíhat obousměrně (Hans H Hirsch, 2005). LTAg se také účastní interakce s proteiny hostitelské buňky, získává faktory potřebné pro replikaci viru. Vazbou na tumor supresorové proteiny Rb, p107, p130 a p53 způsobuje vstup buňky do S fáze buněčného cyklu (Helle et al., 2017).

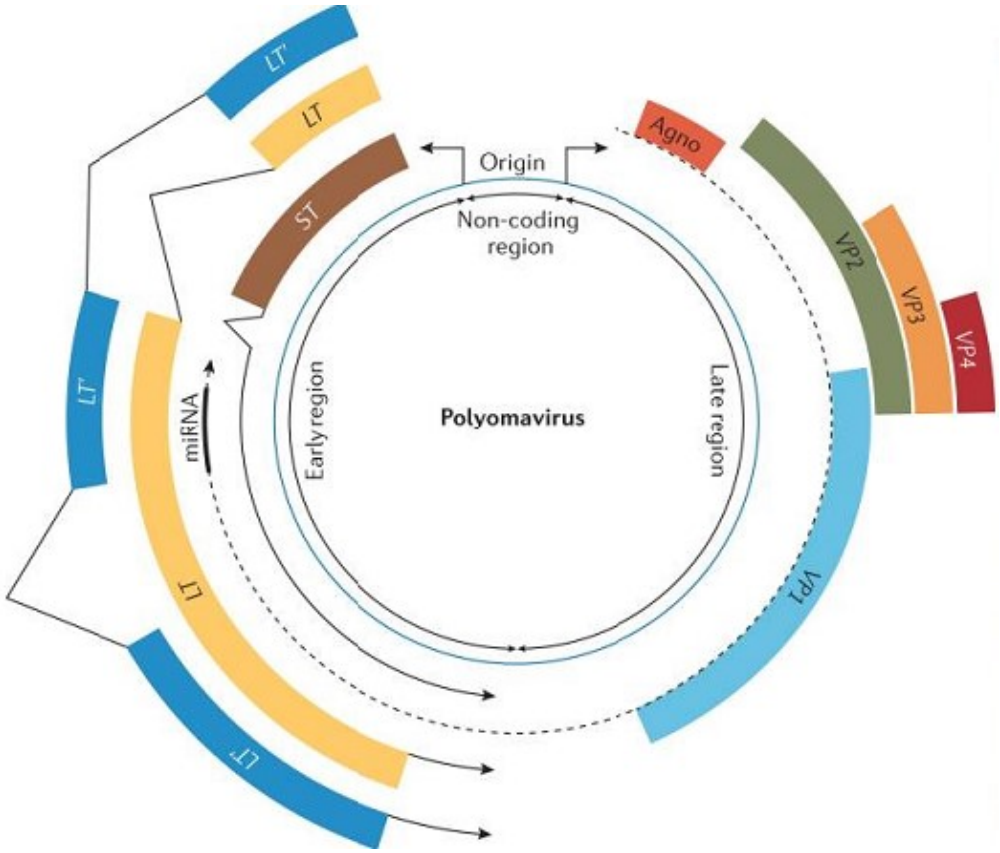
BKV je na základě rozdílů v nesynonymních nukleotidových polymorfismech VP1 klasifikován do čtyř základních séro/genotypů:

- skupina I kóduje prototyp kmenů Dunlop (Dun), MM a GS; celosvětově nejrozšířenější
- skupina II kóduje kmen SB; velmi málo rozšířený

- skupina III kóduje kmen AS; velmi málo rozšířený
- skupina IV kóduje kmen MG; rozšířený zejména ve Východní Asii a Evropě (Dall & Hariharan, 2008)

Fylogenetická analýza dále identifikovala 4 podskupiny skupiny I (Ia, I b-1, Ib-2 a Ic) a 6 podskupin skupiny IV (IVa-1, IVa-2, IVb-1, IVb-2, IVc-1 a IVc-2) (Sawinski & Goral, 2014).

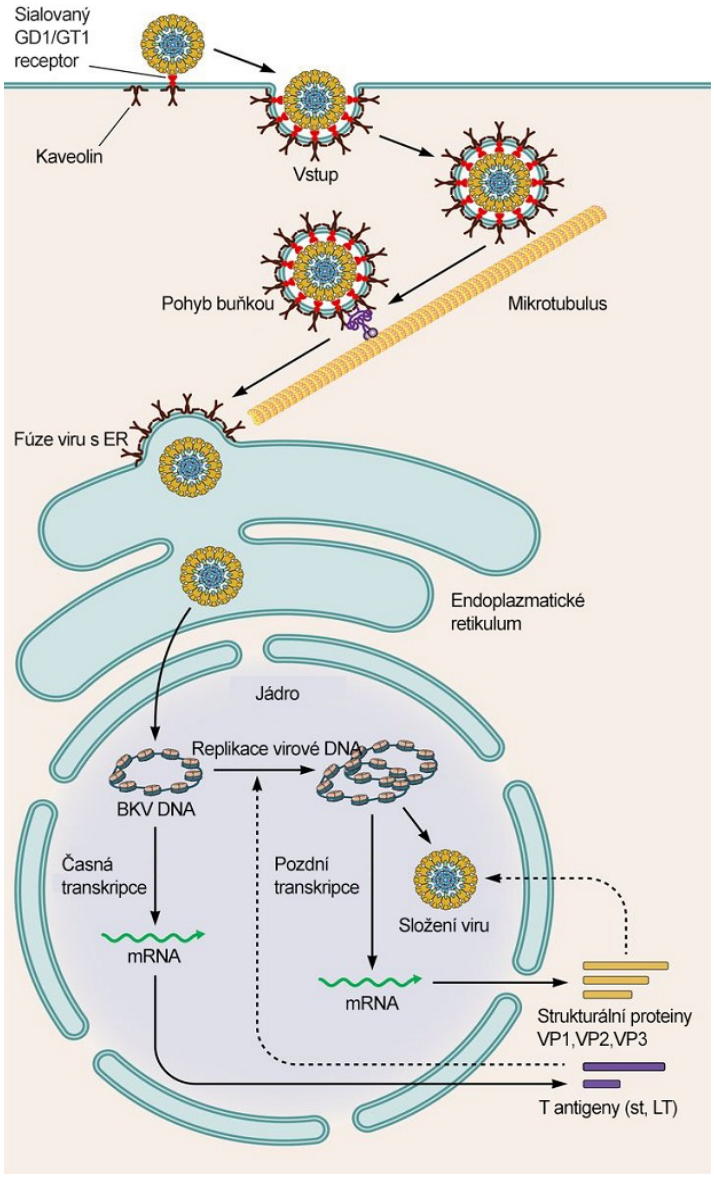
Kromě rozdělení dle polymorfismů ve VP1 lze také rozlišovat podle odlišností v NCCR regionu, a to na archetyp (ww) a změněné varianty (rr „rearanged“) (Ambalathingal et al., 2017). Neexistuje žádná jasná souvislost mezi vylučováním konkrétního subtypu BKV a onemocněním u lidí. Ani imunodeficit nemá dopad na vylučování konkrétního subtypu BKV (De Gascun & Carr, 2013).



Obrázek 2. Schéma prototypového genomu polyomaviru. Otevřené čtecí rámce časného a pozdního regionu jsou znázorněny šipkami s alternativním sestřihem zdůrazněným jednotlivými barvami výsledných produktů. Transkripce časné (Early region) i pozdní (Late region) mRNA začíná v ORI (Origin of replication), který je uložen v NCCR (Non-coding region). Převzato z (Decaprio & Garcea, 2013).

4.4 Pohyb buňkou

Přirozeným cílem BKV jsou epiteliální buňky renálních proximálních tubulů (Moriyama, Marquez, Wakatsuki, & Sorokin, 2007). Schéma vstupu BKV do buňky je znázorněno na Obrázku 3.



Obrázek 3. Vstup do buňky a infekce. Ukázka mechanismu vstupu BKV do buňky, přesun buňkou, vstup do endoplazmatického retikula a vstup do jádra. V buněčném jádru je genom BK viru uložen episomálně. Nejprve se přepisují časné geny, které následně řídí přepis pozdních genů. Převzato z (Ambalathingal et al., 2017).

BKV se nespecificky váže pomocí majoritního VP1 proteinu na povrchové molekuly obsahující motiv α(2,3)-vázané sialové kyseliny. Konkrétní receptory na povrchu cílových

buněk, které umožnují internalizaci viru, jsou GT1b a GD1b receptory (Masutani, Ninomiya, & Randhawa, 2013; Moriyama et al., 2007).

BKV využívá ke vstupu do buněk kaveoly zprostředkovanou endocytózu. Vezikuly obsahující částice BKV se uvnitř cytosolu pohybují v závislosti na mikrotubulech (Eash & Atwood, 2005). Endosomy s viriony dále fúzují s endoplazmatickým retikulem, kde dochází k rozbalení viru. VP2 a VP3 zprostředkovávají vstup do jádra buňky. V buněčném jádře lidských buněk zůstává BK virová DNA v episomální podobě (Cubitt, 2006). V buněčném jádře probíhá transkripce a replikace viru. Dceřiné virové genomy jsou sbaleny pomocí histonů (H2A, H2B, H3 a H4) pocházejících z hostitelské buňky. Kapsidové proteiny BKV se syntetizují v cytoplazmě buňky a po jejich transportu do jádra dochází k sestavení nových dceřiných virových částic (Helle et al., 2017). Po sestavení viru opouští dceřiné viry buňku a napadají buňky sousední. Na těchto procesech se pravděpodobně podílí i agnoprotein. Buňky napadené BKV většinou umírají mechanismem nekrózy, nikoliv apoptózy (Lamarche et al., 2016). Přímo v ledvině vede tento proces k rozvoji BK virové nefropatie (Moens et al., 2017).

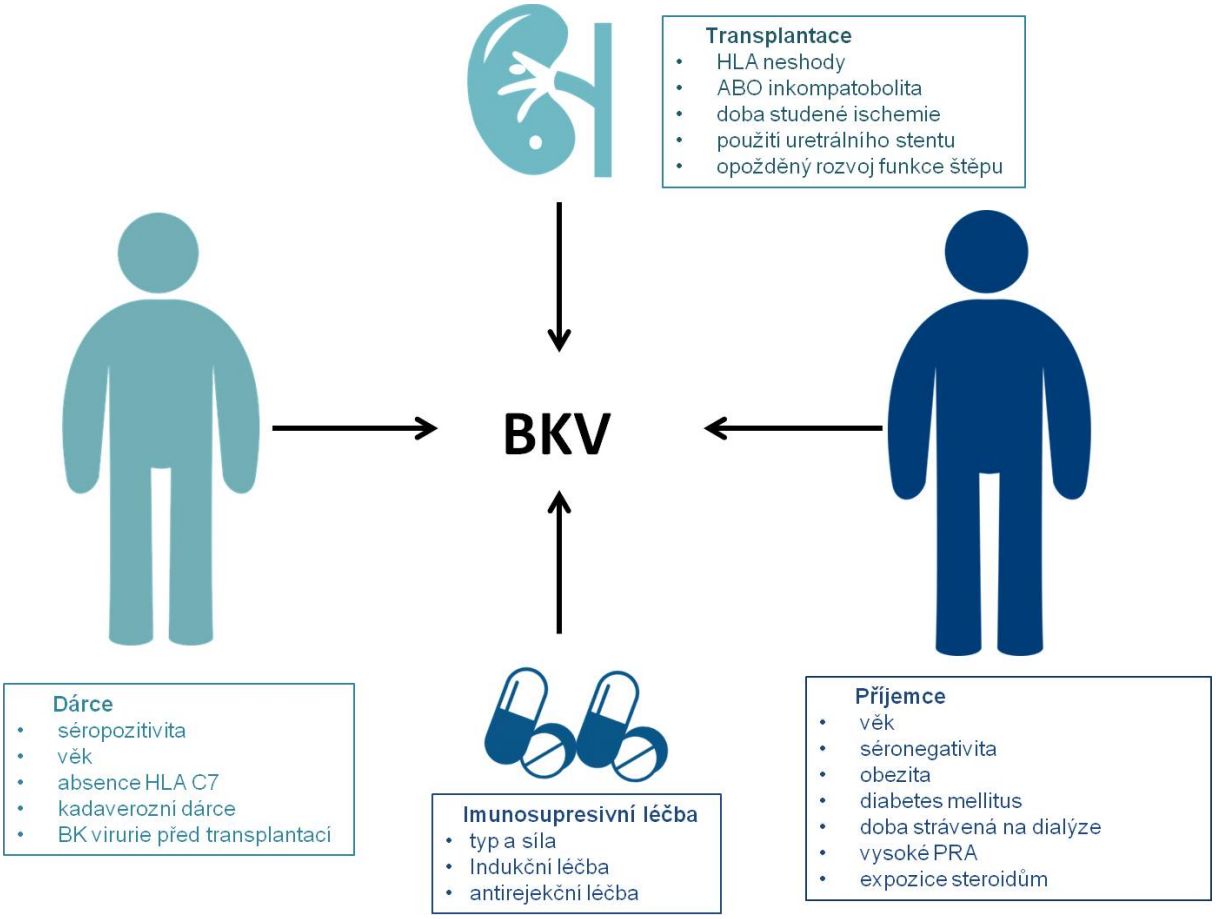
5 BK VIROVÁ NEFROPATIE

BK virová nefropatie (BKVN) je histopatologická nebo ultrastrukturální přítomnost cytopatologických změn, jež vede k tubulointersticiální nefritidě a poškození transplantované ledviny BK virem (C B Drachenberg, Hirsch, Ramos, & Papadimitriou, 2005). První případ BKVN byl popsán v roce 1995, 24 let po objevu BKV. V následujících letech byl evidován postupný nárůst incidence z 1 % v roce 1995 na 1-10 % pacientů po transplantaci ledviny v první dekádě 21. století. U většiny pacientů je BKVN diagnostikována během prvního roku po transplantaci, přibližně 25 % je diagnostikováno později. Ztráta štěpu u pacientů s BKVN se u jednotlivých studií liší, a to od 0 do více než 10 % (Hans H Hirsch et al., 2005; Nickeleit & Mihatsch, 2006).

5.1 Rizikové faktory BKVN

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem rozvoje BKV infekce a následně BKVN je míra imunosupresivní léčby. Avšak ne u všech pacientů s vysokou dávkou imunosuprese dochází k rozvoji BKVN. Proto zásadní roli v rozvoji BKVN jistě hrají další přidružené rizikové faktory, stejně jako imunitní status pacienta (Brennan et al., 2005; Dall & Hariharan, 2008; Krejci, Tichy, Bednarikova, Zamboch, & Zadrazil, 2018; Sawinski & Goral, 2014).

Dalšími uváděnými rizikovými faktory jsou: vyšší věk (Khamash et al., 2007), mužské pohlaví, bílé etnikum, doba studené ischemie orgánu, serostatus dárce/příjemce (Bohl et al., 2008), absence dárcovské HLA C7 alely (Bohl et al., 2005), použití JJ stentu, počet HLA neshod mezi dárcem a příjemcem (Awadalla, Randhawa, Ruppert, Zeevi, & Duquesnoy, 2004), přítomnost komorbidit (diabetes mellitus a cytomegalovirová infekce), úroveň předchozího poškození štěpu (Dall & Hariharan, 2008), počet předchozích akutních rejekcí a jejich léčba (Costa et al., 2009). Přehled rizikových faktorů je uveden na Obrázku 4.



Obrázek 4. Rizikové faktory pro vznik BKVN. Faktory, které zvyšují riziko vzniku BKV infekce, mohou být na straně dárce, příjemce, transplantovaného orgánu a zejména použité léčby.

Imunosuprese

Vzhledem k tomu, že před rokem 1995 byla BKVN diagnostikována jen vzácně, je její zvýšená incidence od poloviny 90. let spojována se zavedením nových, účinnějších imunosupresivních léčiv, jakými jsou takrolimus (Tac), mykofenolát-mofetil (MMF) a některé monoklonální a polyklonální protilátky (Dall & Hariharan, 2008).

Zdá se, že nejdůležitější roli hraje intenzita použité imunosuprese. Mezi jednotlivými imunosupresivními preparáty existují rozdíly, jak ve výskytu replikace BKV, tak i rozvoje BKVN (Brennan et al., 2005). Pacienti s intenzivnější indukcí antithymocytárním globulinem (ATG) mohou mít protrahovanou viremii a vyšší výskyt BKVN oproti pacientům s indukcí anti-CD25. Vyšší viremie byla prokázána i u pacientů s indukcí alemtuzumabem (anti-CD52) oproti pacientům s indukcí basiliximabem (anti-CD20) (Pai et al., 2015).

Riziko rozvoje onemocnění bývá spojováno s použitím takrolimu v porovnání s cyklosporinem a MMF v porovnání s azathioprinem (Brennan et al., 2005).

V randomizované klinické studii vykazovali pacienti léčení MMF významně vyšší BK virurii a výskyt BKVN než pacienti v ostatních skupinách (CsA, everolimus) (van Doesum et al., 2017). Na druhou stranu existují i studie, ve kterých bylo riziko viremie vyšší u pacientů s imunosupresí CsA v porovnání s pacienty na velmi nízkých dávkách Tac (Geddes et al., 2011). Vznik BKVN byl popsán i u pacientů s dalšími udržovacími imunosupresivními režimy (jiné kalcineurinové inhibitory, antimetabolity, mTOR inhibitory a kortikosteroidy) (Beimler, Sommerer, & Zeier, 2007).

Rejekce a antirejekční terapie

Předchozí akutní rejekce je uváděna jako nezávislý rizikový faktor pro vznik BK viremie i BKVN. V literatuře jsou jako rizikové faktory uvedeny všechny typy rejekcí (T buněčná rejekce, protilátkami zprostředkovaná rejekce i steroid-rezistentní rejekce). Vliv předchozí rejekce může spíše souviset s její léčbou než se samotnou prodělanou rejekcí (Dadhania et al., 2008). Popsána byla souvislost mezi počtem kortikosteroidních pulzů, vznikem BK viremie i BKVN (Hans H Hirsch et al., 2002). Je znám případ rychlého selhání štěpu po stanovení mylné diagnózy akutní rejekce při BKVN a podání antilymfocytárního imunoglobulinu (Hans H Hirsch et al., 2005).

Poškození štěpu

U transplantací ledvin dochází k reaktivaci BKV ve větší míře než u jiných transplantací. Zvažuje se vliv poškození ledviny během manipulace, vliv opožděného nástupu funkce štěpu, trvání studené ischémie a poškození použitím ureterálního JJ stentu (Dall & Hariharan, 2008).

Vliv faktorů dárce

Kombinace séropozitivní dárce/séronegativní příjemce zvyšuje jak riziko vzniku viremie, tak BKVN. Grellier a kolegové také nedávno popsali, že předtransplantační BK virurie u živého dárce významně zvyšuje riziko vzniku BKV infekce u příjemce (Grellier et al., 2018).

Vliv neshod HLA a ABO

Některé studie ukazují na trend zvýšeného počtu HLA-neshod mezi dárci a příjemci, u kterých se vyvinula viremie (Hans H Hirsch et al., 2002). Bohl et al. v roce 2005 popsal

závislost mezi přítomností BKV infekce a chyběním alely C7 jak u dárce, tak příjemce (Bohl et al., 2008). Shoda v HLA-A2, B44 a DR15 může mít ochranný vliv proti BK viremii (Masutani et al., 2013). Sharif a kol. uvádějí, že pacienti s ABO inkompatibilitou mezi dárcem a příjemcem mají až 3krát vyšší riziko rozvoje BKVN ve srovnání s pacienty s inkompatibilitou pouze v HLA (Sharif et al., 2012). Opět není jasné, zda příčinou vyššího rizika je zde sama inkompatibilita, nebo takzvaná desenzitizace pro inkompatibilitu (Thomas Schachtner, Stein, & Reinke, 2015).

BKV a CMV

CMV i BKV se mohou po primoinfekci stát latentními, a po transplantaci ledviny může dojít k jejich reaktivaci. Dle Parka (S. B. Park et al., 2006) může polyomavirus navodit genovou expresi CMV stimulací buněčných regulačních proteinů nebo pomocí vlastních regulačních proteinů.

5.2 Diagnóza BKVN

Klinický obraz BKVN

Infekce BK virem u pacientů po Tx ledviny probíhá bez příznaků. Pacienti nevykazují žádné ze systémových projevů virové infekce, a to ani při zvýšených hladinách BK viru v krvi a moči, ani při BKVN onemocnění. Jediným nálezem u pacientů s BKVN často bývá zhoršení funkce štěpu a zvýšení hladiny sérového kreatininu. Existují i pacienti, u kterých jsou v době diagnózy BKVN hladiny kreatininu v normě (Dall & Hariharan, 2008).

Cytologie moči „vyšetření na decoy cells“

BKV infekce může být prokázána přítomností tzv. „decoy buněk“ v moči pacienta. Při BKVN dochází k infekci distálních segmentů tubulů, sběrných kanálků a uroepitelu, následovanou cytolytickými změnami a tubulární destrukcí. Infikované buňky se odlučují a dostávají se do moči pacienta, kde mohou být detekovány jako „decoy buňky“.

„Decoy buňky“ mají výraznou morfologii, zvětšená jádra s virovými inkluzemi. Výhodami vyšetření moči na „decoy buňky“ jsou nízká cena vyšetření, vysoká negativní prediktivní hodnota (100 %) a schopnost časné detekce ještě před rozvojem BKVN. Mezi nevýhody patří nízká specificita (pouze 25 % pozitivních pacientů rozvine BKVN) a opožděná clearance viru z moči po léčbě. Pokud decoy buňky pocházejí z uroepitelu, mohou silně zvětšená

a pozměněná jádra společně s nepravidelným tvarem buněk napodobovat změny pozorované u neoplastických buněk (Fogazzi, Cantú, & Saglimbeni, 2001).

Detekce přítomnosti BKV pomocí PCR

Cenným nástrojem detekce BKV DNA v plazmě, moči či renální tkáni je PCR. Přítomnost/nepřítomnost viru lze potvrdit pomocí standardního PCR, lze použít i senzitivnější „nested PCR". Nejčastěji je využíváno stanovení přesného počtu kopií viru pomocí absolutní kvantifikace real time PCR (qPCR).

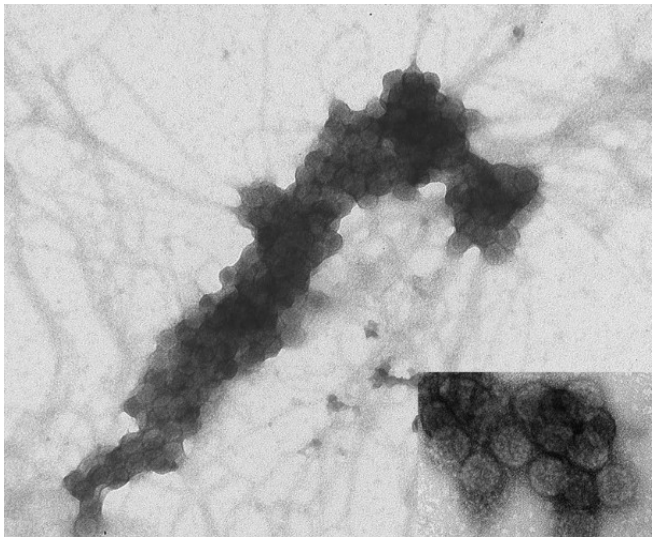
KDIGO doporučuje screening počtu kopií BKV u všech pacientů po Tx ledviny v 1., 2., 3., 6. a 12. měsíci po Tx ledviny. Dále kdykoliv při renální dysfunkci bez viditelné příčiny a vždy po léčbě epizody akutní rejekce (Chapman, 2010). Metody stanovení nejsou plně standardizované a každá laboratoř je zavádí sama, stejně tak jako metody izolace virové DNA. Definované hraniční hodnoty $1x10^7$ kopií/ml moči a $1x10^4$ kopií/ml plazmy, tak mají v různých laboratořích odlišný prediktivní význam (Hans H Hirsch et al., 2005).

Vyšetření mRNA z moči

Alternativní metodou sledování BKV infekce je stanovení mRNA BK virového kapsidového proteinu 1 (VP1) z močových buněk. Pro toto neinvazivní vyšetření byla popsána prahová hodnota $6,5×10^5$ VP1 mRNA/ng RNA jako vysoce prediktivní pro BKVN (Ding et al., 2002).

Vyšetření moči pomocí elektronové mikroskopie

Elektronová mikroskopie moči pacienta představuje další z neinvazivních metod potvrzení přítomnosti BKV infekce. Singh a kol. v roce 2009 představili novou metodu sledování takzvaných PV-Haufen (viz Obrázek 5.), shluků virových částic v moči pacienta. Přítomnost a počet shluků dokáže dobře odlišit pacienty s BKVN oproti pacientům pouze s viremií (Harsharan K. Singh, Reisner, Derebail, Kozlowski, & Nickeleit, 2015).



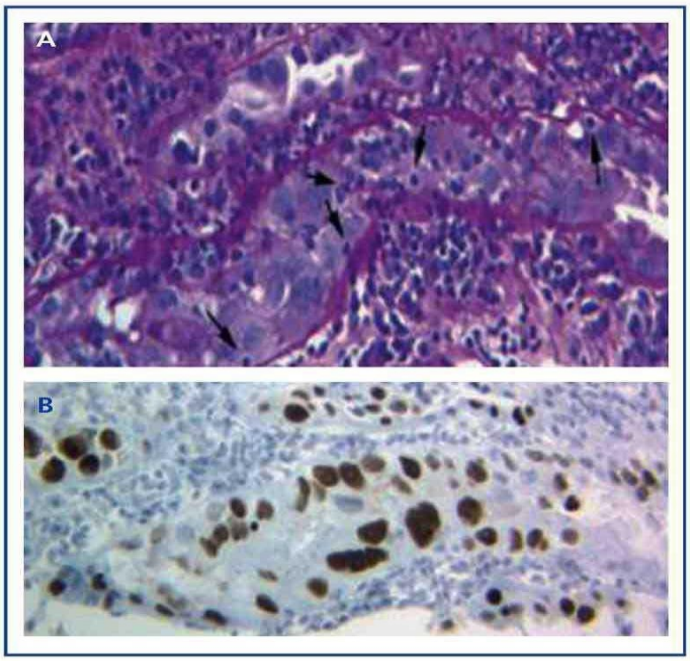
Obrázek 5. Obrázek shluků „PV-Haufen“ ze vzorku moči. Haufen představují trojrozměrné částice obsahující shluky virových částic složené z šesti nebo více jednotlivých virionů polyomavirů. Převzato z (H. K. Singh et al., 2009).

Histologická diagnóza z biopsie ledviny

Diagnóza BKVN je definitivně stanovena až z histologického potvrzení přítomnosti BKV inkluzí v tubulárních nebo glomerulárních buňkách epitelu v biopsii. Výsledek histologického vyšetření může být falešně negativní a to zejména v časných stadiích BKVN. Důvodem je multifokální rozvoj infekce v ledvině, kdy při biopsii nedojde k zachycení poškozeného segmentu (Cinthia B. Drachenberg et al., 2004).

Typickým histologickým nálezem BKVN jsou tubulointersticiální změny s rozptýlenou zánětlivou infiltrací buněk, lýzou, atrofií a nekrózou tubulárního epitelu s expanzí a fibrózou intersticia (Obrázek 6.).

V několika případech byly pozorovány změny v oblasti glomerulů především v epitelu Bowmanova pouzdra (Moriyama & Sorokin, 2009). Infikované buňky mají jádro zvětšené bazofilními inkluzemi, vzniklými na podkladě seskupení nově vzniklých virionů. Diagnóza BKVN je potvrzována imunohistochemicky.



Obrázek 6. (A) Bazofilní jaderné virové inkluze v epiteliálních buňkách a tubulitida u BKVN a (B) obrázek z imunohistochemie po použití antigenu SV-40 LTAg. Převzato z (Burgos, Jironda, Martín, González-Molina, & Hernández, 2010).

K imunohistochemickému průkazu je používáno protilátek proti LT antigenu kmene SV40, který identifikuje všechny polyomavirové kmeny díky zkřížené reaktivitě SV40 s BKV a JCV. BKVN musí být rozlišena od ostatních polyomavirových infekcí, ale především od akutní celulární rejekce. Z morfologického a molekulárního hlediska je zánětlivá infiltrace u akutní celulární rejekce a BKVN nerozlišitelná světelným mikroskopem (C. B. Drachenberg & Papadimitriou, 2006). U BKVN byly v tubulárních bazálních membránách pozorovány depozity C4d, které nejsou přítomny v peritubulárních kapilárách (Dall & Hariharan, 2008).

Jako marker rejekce je na druhou stranu označována zvýšená přítomnost MHC molekul II. třídy v tubulárním epitelu, která u biopsií s BKVN chybí (H. H. Hirsch & Randhawa, 2013). Průkaz převahy CD20 pozitivních lymfocytů (B lymfocyty) v renální histologii může předpovídat BK infekci (Li et al., 2013).

BKVN může být přítomna spolu s jinými histologickými nálezy a v různých stadiích. Byly popsány 3 histologické stupně BKVN a jejich podstupně (Tabulka 2.). Tyto stupně pomáhají rozlišit stadium onemocnění a odhadnout prognózu pacienta.

Tabulka 2. Histologické stupně BKVN dle (H. H. Hirsch & Randhawa, 2013)

Stupeň postižení	Popis	Rozsah postižení tkáně	Funkce štěpu	Riziko ztráty štěpu
PyVAN-A				
Cytopatické změny	mírné	≤25%		
Intersticiální zánět	minimální	≤10%	většinou nezměněná	<10%
Tubulární atrofie	minimální	≤10%		
Intersticiální fibróza	minimální	≤10%		
PyVAN-B				
Virové cytopatické změny	variabilní	11 – >50%		
Intersticiální zánět	významné	11 – >50%		
Tubulární atrofie	mírné	<50%	většinou porušená	50%
Intersticiální fibróza	mírné	<50%		
PyVAN-B1				
Intersticiální zánět	mírné	11–25%	mírně porušená	25%
PyVAN-B2				
Intersticiální zánět	významné	26–50%	významně porušená	50%
PyVAN-B3				
Intersticiální zánět	rozsáhlé	>50%	významně porušená	75%
PyVAN-C				
Cytopatické změny	variabilní	variabilní		
Intersticiální zánět	variabilní	variabilní	významně porušená, selhávání štěpu	>80%
Tubulární atrofie	rozsáhlé	>50%		
Intersticiální fibróza	rozsáhlé	>50%		

5.3 Imunitní odpověď při BKV infekci a BKVN

Citlivost jednotlivých příjemců ledvin na imunosupresivní léčbu je odlišná, a to navzdory podobným hladinám imunosupresivních léků změřených v krvi. Mnoho studií potvrdilo, že výsledek BK virové infekce závisí na funkčnosti antivirové imunitní odpovědi pacienta. Nové techniky měření imunitní odpovědi pomáhají získat informace o imunologickém stavu příjemce a konkrétních typech buněk zapojených v imunitní odpovědi proti BKV (Babel, Volk, & Reinke, 2011).

Vrozená imunitní odpověď

Vrozené imunitní mechanismy hrají zásadní roli v rozpoznání virové infekce, potlačení replikace a aktivaci adaptivní imunitní odpovědi. Womer s kolegy prokázali vliv sníženého

počtu dendritických buněk na vznik viremie i BKVN (Womer et al., 2010). Bohl et al. ve studii naznačil úlohu inhibičních a aktivačních KIR receptorů NK buněk při BKV infekci (Bohl & Brennan, 2007). Byl popsán vztah mezi nízkým počtem aktivačních receptorů NK buněk a špatnou kontrolu BK virové infekce (Trydzenskaya et al., 2013).

Zkoumán byl i vliv jednotlivých buněčných mediátorů patřících k mechanismům vrozené imunity. Dugan prokázal, že lidský defensin 5 je schopen inhibovat vazbu BKV na hostitelské buňky pomocí agregace virů (Dugan, Eash, & Atwood, 2006). Pomocí měření mRNA byla BKV infekce primárních epiteliálních buněk asociována s vyšší expresí TLR3 (Abend, Low, & Imperiale, 2010).

Humorální imunitní odpověď

Předchozí setkání s virem je možno prokázat jako přítomnost specifických BKV IgG protilátek v oběhu. BKV specifické protilátky byly zjištěny u 80-100 % běžné populace (Egli et al., 2009). BKV séronegativita koreluje s vyšším rizikem BKV reaktivace a rozvojem BKVN u dětských pacientů. Séropozitivita neposkytuje ochranu před reaktivací viru a rozvojem BKVN po transplantaci (Bohl et al., 2008). Detekci a zvýšené hodnoty IgM lze využít jako diagnostický ukazatel u akutní BKVN. Jedinci s BKVN mají zvýšenou viremii a snížené specifické IgG, pacienti ve fázi rekonvalescence mají naopak vysoké specifické IgG (Patrizia Comoli et al., 2013; Dall & Hariharan, 2008).

U příjemců od séropozitivních dárců se titr protilátek zvyšuje bez ohledu na původní sérostatus. To naznačuje, že BKV přenesen od dárce transplantovanou ledvinou může vyvolat u příjemce novou primární i humorální odpověď (Lamarche et al., 2016). Odlišné genotypy mohou uniknout neutralizaci protilátkami proti jinému genotypu (Ambalathingal et al., 2017).

Buněčná imunitní odpověď

Buněčná adaptivní imunita je nezbytná pro kontrolu BK virové infekce, důležitou roli v ní hrají jak CD4+, tak CD8+ T lymfocyty.

Pomocí průtokové cytometrie a metody ELISPOT bylo prokázáno, že všech 5 proteinů BKV (VP1, VP2, VP3, LT, sT) je schopno vyvolat imunitní odpověď. BKV specifické T-lymfocyty prokazatelně produkují IFN-γ, IL2 a TNF-α. Všichni pacienti po transplantaci ledviny mají

snížený počet BK specifických T buněk oproti zdravým jedincům (Patrizia Comoli et al., 2004). Buněčná imunitní odpověď proti antigenům LT a VP1 je vyšší u pacientů s klesající nebo překonanou viremií ve srovnání s pacienty se stoupající nebo přetrvávající viremií nebo BKVN. Ve studii Schmidta et al., měli pacienti s BKV po transplantaci více BK-specifických T buněk, ale méně polyfunkčních ve srovnání s pacienty bez BKV po Tx ledviny (Schmidt et al., 2014). Pacienti, kteří dokázali virus eliminovat, měli zvýšený počet BK specifických T buněk do 1 měsíce po diagnóze, naopak pacienti s prokázanou BKVN v biopsii potřebovali k vytvoření specifických T buněk významně delší dobu (5 měsíců) (T. Schachtner et al., 2011). Monitorace specifické imunitní odpovědi po transplantaci může pomoci odhadnout riziko rozvoje BKVN (Sawinski & Goral, 2014).

5.4 Léčba BKVN

Prozatím neexistují léky, které by konkrétně cílily proti BKV ani proti ostatním lidským polyomavirům.

Preemptivní léčba

U pacientů, u kterých je screeningem zjištěna dlouhotrvající viremie (4 a více týdnů), je doporučováno preemptivní snížení imunosuprese (Hans H Hirsch et al., 2005). Brennan již v roce 2005 publikoval práci, kdy na základě monitorovací studie snížil imunosupresi (v prvním kroku vysazení AZA/MMF, v druhém snížení dávky CsA nebo Tac) u pacientů s významnou viremií. Do studie bylo zařazeno 200 pacientů a u žádného z nich nakonec nedošlo k rozvoji BKVN (Brennan et al., 2005). Podobně v dalších studiích předešlo snížení IS u pacientů s viremii vzniku BKVN (Ginevri et al., 2007). Riziko následných akutních rejekcí bylo publikováno jako velmi nízké 0-14% (S. et al., 2010; Sood et al., 2012).

Léčba již rozvinuté BKVN

Za základní terapeutický krok je u pacientů s BKVN považováno snížení imunosuprese (Hans H Hirsch et al., 2005). Snížení imunosuprese s sebou nese riziko vzniku následné akutní rejekce, která může být posléze histologicky těžko odlišitelná od BKVN ve stadiu rekonvalescence (Ambalathingal et al., 2017).

Jednou z terapeutických strategií je převod pacienta na jiný typ imunosuprese. V našem centru je nejčastěji pacient převeden z takrolimu na cyklosporin. V dalším kroku je sníženo množství podávaných antimetabolitů, případně podána další léčba.

Zajímavé výsledky přinesly experimentální práce s mTOR inhibitory. Studie s lidskými tubulárními epiteliemi ukázaly, že mTOR inhibitory mohou inhibovat ribozomální podjednotky a tím bránit replikaci viru. U pacientů po Tx ledviny byla léčba mTOR inhibitory při dvouletém sledování spojena s nižším výskytem BKVN. Nejnovější výsledky studie TRANSFORM ukazují, že výskyt BKV infekce a BKVN je nižší u pacientů léčených everolimem oproti kalcineurinovým inhibitorům (C. et al., 2019).

V současné době jsou podle pokynů AST doporučeny další dvě strategie: (i) snížení dávky kalcineurinových inhibitorů o 25-50 % v jednom nebo dvou krocích, následované snížením antimetabolitů o 50% s jejich následným vysazením; (ii) snížení antimetabolitů o 50%, následované snížením kalcineurinových inhibitorů o 25-50 % a následným přerušením podávání antimetabolitů (Schmidt et al., 2014). Viremie by měla vymizet během 4-6 měsíců od snížení imunosuprese, pokud nevymizí, je indikováno podání další léčby.

V mnoha studiích byly popsány léky s dosud nepotvrzenou aktivitou proti BK viru. Vzhledem k tomu, že jejich použití je většinou kombinováno se snížením imunosuprese, je jejich účinnost těžko hodnotitelná.

Leflunomid je protizánětlivý lék, schválený pro použití při léčbě revmatoidní artritidy. Má antivirové a imunosupresivní účinky, čehož by mohlo být využito při léčbě BK virové nefropatie. Převedení z mykofenolát mofetilu na leflunomid je jednou z doporučovaných terapeutických možností. Použití leflunomidu je spojováno s výrazným ústupem viremie. Data z větších prospektivních randomizovaných studií chybí. Leflunomid má ale významné toxické účinky, včetně hepatitidy, hemolýzy, trombotické mikroangiopatie a dalších (Nesselhauf, Strutt, & Bastani, 2015). Z nových léků přichází do úvahy ještě léčba **cidofovirem.** Cidofovir je nukleosidový analog schválený pro použití při cytomegalovirové retinitidě. Mechanismus účinku proti BKV je nejasný. Cidofovir je podáván nejčastěji 1-3 týdny intravenózně. Jeho použití bylo reportováno v několika centrech, nejčastěji ve formě retrospektivních observačních studií. Cidofovir je ale silně nefrotoxický a má vážné nežádoucí účinky (Kadambi et al., 2003).

Nedávno byl v léčbě vyzkoušen **brincidofovir** (CMX001), experimentální prekurzor cidofoviru, u kterého byl prokázán antivirový účinek a lepší profil nežádoucích účinků (Reisman, Habib, McClure, Latiolais, & Vanchiere, 2014).

Léčba **lidským intravenózním imunoglobulinem** vychází z experimentálních prací, které prokázaly přítomnost anti BKV protilátek v tomto preparátu. Lidský imunoglobulin má také imunomodulační účinky, které mohou být benefitem pro pacienty, u kterých byla snížena imunosuprese (Randhawa et al., 2015). Léčba BK viremie a BKVN lidskými imunoglobuliny byla úspěšná u pacientů se špatnou odpovědí na léčbu leflunomidem. Léčba IVIG může být úspěšná zejména u pacientů s hypogammaglobulinémií nebo u pacientů s BKVN v kombinaci s akutní rejekcí (Vu, Shah, Ansari, Naraghi, & Min, 2015). Použití IVIG zatím není podloženo randomizovaně kontrolovanou studií a používá se spíše jako off label léčba na základě lokálních zkušeností daného centra.

Přestože **fluorochinolony** mají in vitro antivirové účinky, studie s levofloxacinem na pacientech po Tx ledviny u nich neprokázala schopnost snížit replikaci ani zlepšit funkci štěpu. Určitý benefit na profylaxi BKVN byl pozorován při podávání ciprofloxacinu, bohužel efekt byl pouze krátkodobý a po 12 měsících byl výskyt BK virová nefropatie stejný i v neléčené kohortě příjemců (Lee et al., 2014). Dle meta-analýzy 8 studií jsou fluorochinolony v prevenci i léčbě BKVN neefektivní (Song et al., 2016).

Buněčná imunoterapie je slibnou alternativou k současným možnostem léčby. Použití T buněk pro buněčnou terapii k obnovení antivirové imunity byla u imunosuprimovaných pacientů poprvé zmíněna v 90. letech.

Blyth a kolegové publikovali v roce 2011 práci popisující expanzi specifických T buněk pomocí stimulace překryvnými peptidy všech pěti BK virových proteinů (Blyth et al., 2011). Zatím byly tyto lymfocyty použity například v léčbě pacientů po transplantaci hematopoetických buněk s BKV infekcí, a to s dobrým výsledkem (Pello et al., 2017).

5.5 Retransplantace u pacientů po BKVN

U pacientů, u kterých došlo k selhání štěpu na podkladě BKVN, není retransplantace kontraindikována. K reaktivaci BKV dochází zhruba u 15 % retransplantovaných pacientů. Před retransplantací se doporučuje potvrdit absenci polyomavirové replikace, po

retransplantaci zvýšit frekvenci screeningu virurie a viremie (Midlova et al.). V roce 2010 byla publikována multicentrická analýza OPTN, dle které došlo ke ztrátě štěpu ve spojení s BKVN u 826 pacientů, z nichž následně 126 podstoupilo retransplantaci. Pouze u jediného pacienta došlo následně ke ztrátě štěpu přímo z důvodu BKVN. U dalších 17 % selhaných retransplantovaných štěpů byla v době selhání podávána léčba v souvislosti s BK virovou infekcí (Dharnidharka, Cherikh, Neff, Cheng, & Abbott, 2010).

6 CÍLE PRÁCE

1. Provést jednoroční monitoraci BK virové replikace u pacientů po transplantaci ledviny, stanovit hraniční hodnoty BK viremie a virurie pro rozvoj BKVN a zhodnotit rizikové faktory.

2. Stanovit expresní profil transkriptů spojených s imunitní odpovědi v biopsiích ledvin u pacientů s bezpříznakovou BK virurií a u pacientů s BKVN.

3. Retrospektivně zhodnotit incidenci, rizikové faktory, použitou léčbu a dlouhodobé výsledky u pacientů s BKV infekcí a BKVN a v IKEM v letech 2009-2018.

7 MONITOROVACÍ STUDIE

V době vzniku této studie nebyla v IKEM dostupná metoda stanovení replikace BK viru. Hlavním cílem práce bylo provést měření hladiny BK viru v moči a krvi u pacientů v prvním roce po transplantaci ledviny na klinice nefrologie IKEM, v letech 2007 a 2008. Dalším krokem bylo vyhodnocení incidence reaktivace BK viru, BK viremie $>10^4$ kopií/ml séra, BK virurie $>10^7$ kopií/ml moči, BKVN a stanovení hraničních hodnot viremie a virurie pro rozvoj BKVN. Předpokládali jsme, že měření reaktivace BK viru pomůže určit pacienty s vysokým rizikem vzniku BKVN.

7.1 Metodika

Pacienti

Do studie bylo zařazeno 120 konsekutivních pacientů, kteří od března 2007 do března 2008 v IKEM v Praze podstoupili transplantaci ledviny, a byly od nich získány všechny potřebné vzorky. Od pacientů byly odebrány vzorky periferní krve a moči, a to v časových intervalech: 1. den po Tx ledviny a 1., 3., 6., 9., 12. měsíc po Tx ledviny. Protokol studie byl řádně schválen etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze a všichni pacienti stvrdili účast ve studii podpisem informovaného souhlasu.

Funkce ledvin byla hodnocena stanovením hladiny sérového kreatininu, eGFR a proteinurie. Demografické a klinické údaje pacientů jsou shrnuty v Tabulce 3. Pozitivní viremie byla definována jako $>10^4$ kopií/ml séra a pozitivní virurie $>10^7$ kopií/ml moči, dle doporučení prof. Hirsche (Hans H Hirsch et al., 2005).

Zpracování vzorků krve

Krev byla odebrána do zkumavek VACUETTE® 5 ml sérum/gel a pomocí centrifugace 3000 rpm/10 min získáno sérum. Moč i sérum byly skladovány při -20˚C až do doby dostatečného nashromáždění vzorků pro izolaci virové DNA.

Tabulka 3. Demografická data pacientů v monitorovací studii

Demografická data pacientů v monitorovací studii (n=120)	
Věk (roky)	54 (18-77)
Pohlaví (počet mužů, %)	77 (64%)
BMI	25,02 (17,05-34,54)
Primární onemocnění: (%)	
Polycystická choroba ledvin	19
Glomerulonefropatie	47
Hypertenze	18
Intersticiální nefritida	24
Diabetes mellitus	8
Jiné	4
HLA neshody (průměr)	3,13±1,55
První štěp (počet, %)	97 (81%)
PRA (počet, %)	
<20%	77 (64%)
20-80%	35 (29%)
>80%	8 (7%)
CMV serostatus (%)	
D-/R-	9%
D-/R+	20%
D+/R-	13%
D+/R+	58%
Imunosuprese	
Indukce	43%
Takrolimus	75%
Cyklosporin A	18%
Sirolimus	3%
CIT hodiny (min, max)	17,39 (0-25,9)

PRA=panel reaktivní protilátky; BMI=body mass index; CIT=doba studené ischemie

Izolace BKV DNA

Extrakce a purifikace BKV-DNA ze vzorků séra a moči byla provedena pomocí separační technologie na magnetické kuličky, použit byl Chemagic Viral DNA / RNA (Chemagen, DE).

200 µl vzorku séra/moči bylo inkubováno s proteázou a lyzačním pufrem. Do zkumavky byly přidány magnetické kuličky. Po inkubaci byly vzorky vloženy do magnetického separátoru, pomocí kterého byly odděleny magnetické kuličky s navázanými nukleovými kyselinami od zbytku vzorku. Následovalo odpipetování zbývajícího vzorku a dvojité promytí. Po dvou promývacích krocích byly nukleové kyseliny eluovány v objemu 50 µl elučního pufru a magnetické kuličky byly odděleny od vzorku.

BKV-DNA kvantifikace v moči a séru

Počet BKV kopií byl ve vzorcích stanovován pomocí metody absolutní kvantifikace real-time PCR, která udává přesné množství templátu na počátku reakce v daných jednotkách (počet kopií viru). Pro absolutní kvantifikaci pomocí real-time PCR byla použita souprava Alert BKV Q-PCR (Chemagen, DE), využívající detekci virového genu kódujícího velký T-antigen BKV, a přístroj ABI Prism® 7900 H.T. System Sequence Detection (Applied Biosystems, CA, USA).

PCR amplifikace byla připravována v reakčním objemu 25 µl, který obsahoval 5 µl extrahovaného vzorku nebo pozitivní/negativní kontrolu. Aby byly všechny pokusy srovnatelné, byly na každé 96jamkové destičce kromě kvantifikovaných vzorků i vzorky pro standardní křivku, vzorky negativní a pozitivní kontroly. Všechny kvantifikované vzorky byly měřeny v duplikátech.

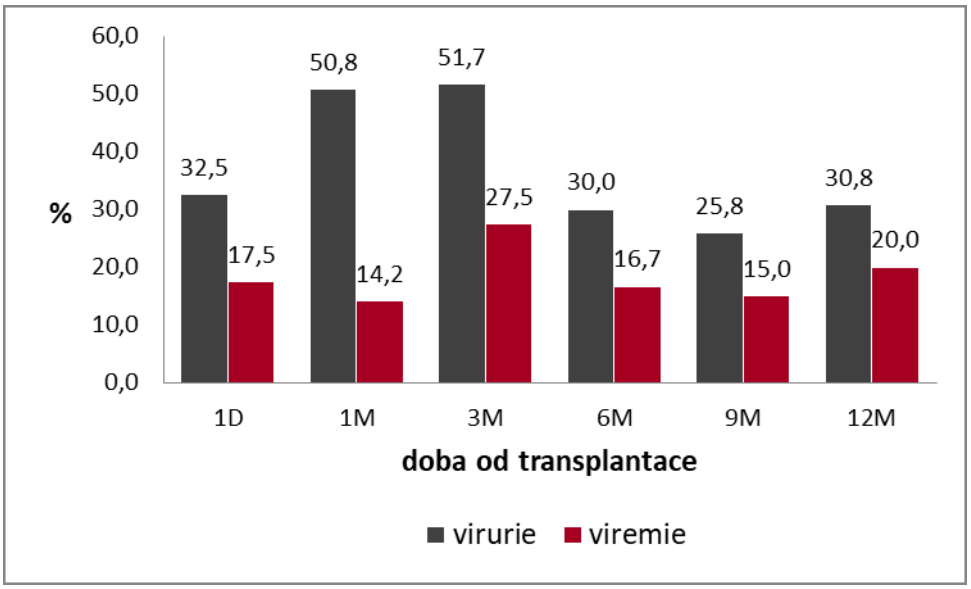
Standardní křivky pro absolutní kvantifikaci viru byly zkonstruovány vynesením Ct hodnot proti logaritmům ředicí řady templátu v rozmezí od 10^2 do 10^5. V případě, že rozdíl mezi duplikáty vzorků byl více než 0,5 Ct, bylo měření tohoto vzorku opakováno. Každý vzorek byl podroben současnému stanovení housekeeping genu lidského β-globinu. Výsledky byly přijatelné pouze v přítomnosti pozitivity na β-globin.

7.2 Výsledky

BK virurie a viremie ve sledovaném souboru pacientů

Celkem bylo analyzováno 1243 vzorků od 120 pacientů (622 z moči a 621 ze séra). Obrázek 7. ukazuje počty pacientů, kteří měli měřitelnou replikaci BK viru (BK virurie $>10^2$, BK viremie $>10^2$) v jednotlivých časových úsecích od transplantace, k reaktivaci nejčastěji docházelo v 1. a 3. měsíci po transplantaci. Pouze 14 pacientů mělo negativní výsledky ve všech odběrech po celý první rok po Tx ledviny.

BK virurie $>10^7$, BK viremie $>10^4$ se v naší studii vyskytly u 25,8 % (n = 31), 5 % (n = 6); během 12měsíčního sledování. Nejvyšší výskyt BK virurie $>10^7$, BK viremie $>10^4$ byl ve 3. a 12. měsíci po transplantaci.



Obrázek 7. Na grafu jsou uvedeny počty pacientů s měřitelnou viremií $>10^2$ a virurií $>10^2$ během prvního roku po transplantaci.

Pacienti s BKVN

U třech ze 120 pacientů se rozvinula histologicky prokázaná BKVN. U žádného z těchto pacientů nedošlo ke ztrátě štěpu. U prvního a druhého pacienta byla původní imunosupresivní léčba tvořena kombinací Tac + MMF + prednison, u třetího pacienta kombinací na CsA + MMF + prednison. První pacient byl v rámci léčby BKVN převeden z Tac na CsA, u druhého byl vysazen MMF. V rámci sledování u obou těchto pacientů došlo k úplné

eliminaci viru. Třetí pacient byl převeden z CsA + MMF + prednison na dvojkombinaci mTOR a MMF, což také vedlo k úplné eliminaci viru (Tabulka 4.).

Pacienti s BK viremií >10^4 kopií/ml séra

U šesti pacientů přesáhly hodnoty BK viremie >10^4 kopií/ml séra. U jednoho z těchto pacientů byla BKVN potvrzena biopticky, u tří pacientů se BK viremie ukázala jako přechodná. Jeden pacient vykazoval trvale vysoké viremie i virurie v době, kdy u něj byla prokázána akutní rejekce (ACR IIa) a CMV onemocnění, ale BKVN u něj biopticky prokázána nebyla. Jeden z pacientů byl klinicky stabilní, i přestože hodnoty BK viremie i virurie u něj trvale přesahovaly hraniční hodnoty: BK virurie (>10^8 kopií/ml) a viremie (>10^4 kopií/ml), a to ve čtyřech po sobě jdoucích měřeních během sledování. Ve srovnání s pacienty v kontrolní skupině byli pacienti s viremií >10^4 před Tx ledviny déle dialyzováni (Tabulka 5).

Tabulka 4. Demografické údaje pacientů s BKVN a jejich výsledky

věk/pohlaví	**pacient 1** 44 let/žena	**pacient 2** 55 let/muž	**pacient 3** 60 let/muž
ESRD	Polycystické ledviny	Grawitzův tumor	CHRI DM I
BK viremie při BKVN (počet kopií/ml)	1,1x10^3	2,2x10^3	7,1x10^7
BK virurie při BKVN (počet kopií/ml)	1,3x10^9	1,6x10^6	1,2x10^3
BKVN+ bioptický nález	BKVN, ACR IB	BKVN, ACR IA	BKVN, DM transfer
Kreatinin v čase diagnózy BKVN (µmol/l)	85	218	135
Počet předchozích biopsií	0	1	0
Předchozí nález v bipopsii	0	normální	0
Počet následujících biopsií	1	0	0
Nález v následující biopsii	BKVN, ACR I B		hraniční nález, IFTA
Výsledek	funkční štěp	funkční štěp	funkční štěp
Původní terapie	Tac, MMF, P	Tac, MMF, P	CsA, MMF, P
Terapie při diagnóze BKVN	Tac, MMF, P	mTOR,MMF, P	CsA, MMF, P
Terapie po diagnóze BKVN	změna Tac na CsA	odebrání MMF	změna CsA na mTOR +odebrání MMF

Pacienti s BK virurií >10^7 kopií/ml moči

Dle doporučení prof. Hirsche z roku je kvantitativní „cut off“ pro BKV v moči >10^7 kopií/ml moči (Hans H Hirsch et al., 2005). 31 pacientů z naší studie vykazovalo hodnoty BK virurie

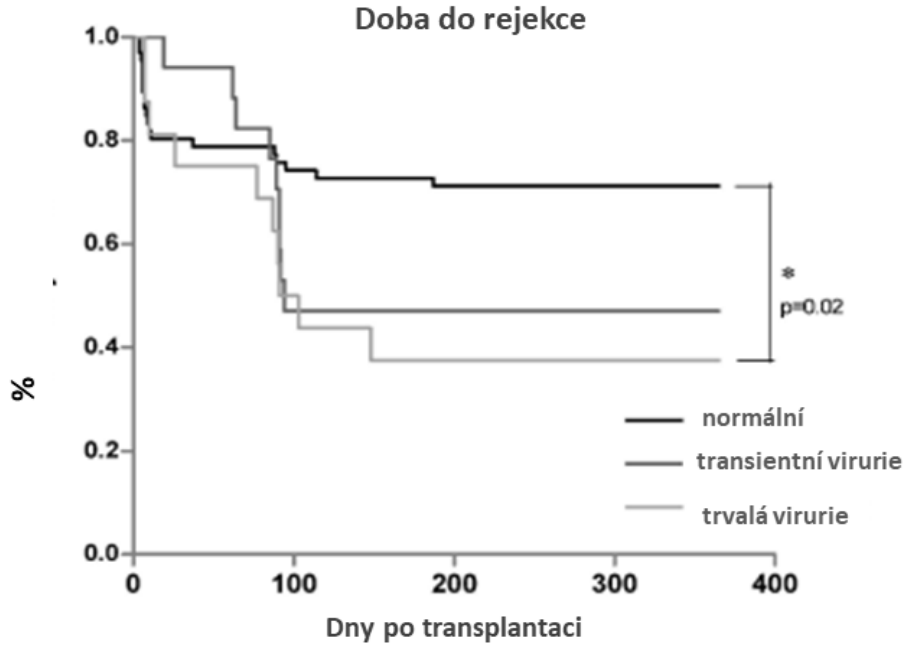
>10^7 kopií/ml moči. Ve srovnání s pacienty v kontrolní skupině byli pacienti s virurií >10^7 déle dialyzováni a vykazovali sníženou funkci štěpu v 1. roce po Tx (p<0,05), (Tabulka 5).

Trvalá a přechodná virurie

U 13 pacientů (10,8%) byla nalezena trvalá pozitivita na BKV v moči (dvě nebo více po sobě následující detekce BK virurie >10^7 kopií/ml) a u 18 (15 %) pacientů pozitivita přechodná (jedna detekce BK virurie >10^7 kopií/ml v moči). Medián BK virové nálože u pacientů s trvalou a přechodnou virurií byl 3,3x10^7(1x10^6 - 5,8x10^8) a 5,3x10^8 rozsah (6,4x10^7 - 1,4x10^{10}); respektive, (p<0,05). BK viremie u pacientů s trvalou a přechodnou virurií vykazovala marginální rozdíl, 0 (0 - 1,1x10^3) a 5,6x10^3 rozsah (0 - 1,14x10^5), (p=0,08).

BKV reaktivace trvalá versus přechodná a vztah k akutní rejekci

Ve skupině pacientů s trvalou virurií byl podíl pacientů, u kterých došlo během prvního roku po transplantaci ke vzniku akutní rejekce významně vyšší, než u pacientů bez BKV reaktivace (p <0,05), (Obrázek 8.). Mezi skupinami nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v hodnotách PRA ani v ne/použití indukční léčby.



Obrázek 8. Kaplan-Meierova křivka času do rejekce

Imunosuprese jako rizikový faktor pro replikaci BKV v moči

Ze 120 sledovaných pacientů byla u 90 imunosupresivní terapie založena na trojkombinaci Tac + MMF + steroidy, z této kohorty 2 se u dvou pacientů rozvinula BKVN a 25 pacientů vykazovalo replikaci BKV v moči vyšší než > 10^7. Imunosupresivní terapie 22 pacientů byla založena na trojkombinaci CsA + MMF + steroidy, při jejímž podání je popisováno nižší riziko vzniku BKVN, i přesto se u jednoho z těchto pacientů rozvinula BKVN a u 4 byla replikace BKV v moči vyšší než 10^7. Mezi pacienty s různými imunosupresivními protokoly nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl související s rozvojem BKVN či přítomností BK viru.

Tabulka 5. Charakteristika pacientů s viremií více než 10^{4} kopií/ml a virurií více než 10^{7} kopií/ml

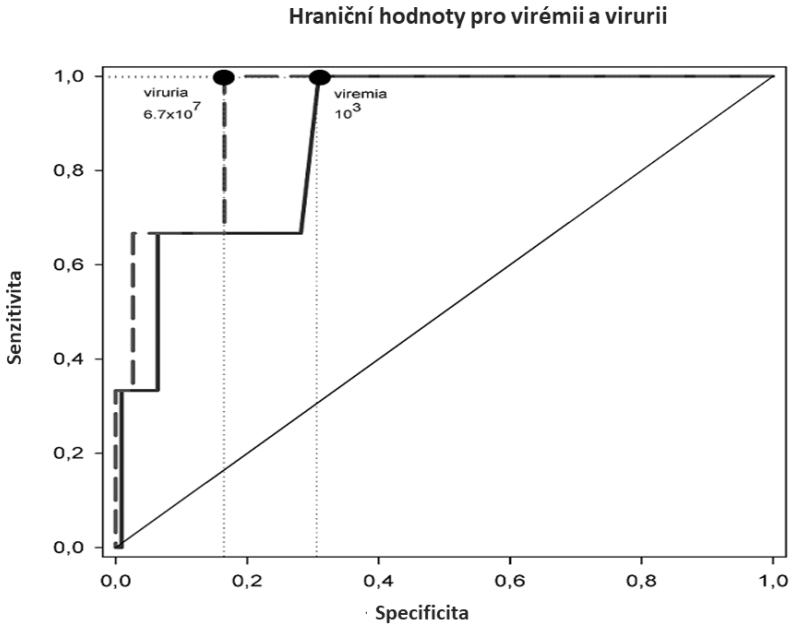
Skupina	10^{7} v moči (n=31)	10^{4} v séru (n=6)	kontrolní (n=85)	P
Věk (roky)	55(27-79)	54(30-72)	54(18-75)	Ns
Pohlaví (muži, %)	20(65)	5(83)	55(66)	Ns
Věk dárce (roky)	52(18-77)	52(33-58)	53(22-77)	Ns
Žijící dárce (počet, %)	4(40%)	1(17%)	21(25%)	Ns
CIT (hodiny)	17(0-24)	18(13-21)	18(0-26)	Ns
BMI	25(19-33)	27(23-30)	25(17-34)	Ns
HLA neshody	3(0-5)	3(2-5)	4(0-6)	Ns
První štěp (n, %)	23(74)	5(83)	69(83)	Ns
Nejvyšší PRA	4(0-98)	6(4-90)	2(0-98)	*a
CMV sérostatus (%)				Ns
D-/R-	11	0	12	Ns
D-/R+	19	20	10	Ns
D+/R-	4	0	8	Ns
D+/R+	66	80	69	Ns
imunosuprese (%)				Ns
indukce	63	60	52	Ns
takrolimus	80	67	71	Ns
cyklosporin A	13	33	16	Ns
doba dialýzy (týdny)	37(0-155)	53(31-155)	21(0-83)	*a,
sérový kreatinin v 12m	111(68-170)	161(125-170)	124(65-244)	Ns
proteinurie g/24h v 12m	0,17(0,0-2)	0(0-2)	0,1(0-2)	Ns
eGFR v 12m	0,93(0,65-1,47)	0,71(0,65-0,75)	0,77(0,4-1,78)	*b
počet rejekcí 3m (průměr±SD) (průměr±SD) ve 3m	0,35±0,6	0,67±0,52	0,38±0,49	Ns
počet rejekcí 12m (průměr±SD)	0,44±0,71	0,83±0,75	0,55±0,78	Ns

Data uvedena jako medián(min-max); CIT=doba studené ischemie; PRA=panel reaktivní protilátky; BMI=body mass index; 3m=3 měsíc po Tx;, 12m=12 měsíců po Tx,*(p<0,05); **(p<0,01); a=rozdíl mezi skupinami 10^{4} kopií/ml v séru a kontrolní; b=rozdíl mezi 10^{7} kopií/ml v moči a kontrolní; Ns=nevýznamný

Hraniční hodnoty BK viremie a virurie pro vznik BKVN ve sledovaném souboru

Pomocí ROC analýzy sledovaného souboru byly stanoveny hraniční hodnoty pro vznik BKVN na 10^3 kopií/ml séra pro BK viremie a $6{,}7x10^7$ kopií/ml (Obrázek 9.).

34 pacientů vykazovalo viremii $>10^3$ a $<10^4$ kopií/ml séra. U dvou z těchto pacientů došlo k rozvoji BKVN, ostatní pacienti neměli žádné klinické ani histopatologické známky BKVN. Podle námi zvoleného cut off bylo 40 pacientů v riziku vzniku BKVN.



Obrázek 9. ROC křivka pro stanovení hraničních hodnot BK viremie a virurie pro vznik BKVN.

Pro rozvoj BKVN byla jako hraniční stanovena hodnota počtu kopií BK viru v séru více než 10^3 kopií/ml, vykazující senzitivitu 100 % a specificitu 69 %. Hodnota BKV kopií více než $6{,}7x10^7$ kopií/ml vykazovala senzitivitu 100 % a specificitu 83 % pro rozvoj BKVN.

7.3 Diskuse

Zavedení techniky monitorace BK viremie a virurie v Transplantační laboratoři kliniky nefrologie IKEM popsané v první studii této práce bylo stimulem k pravidelnému sledování pacientů s transplantovanou ledvinou. V publikovaných monitorovacích studiích se frekvence pacientů s detekovatelnou reaktivací BKV a diagnózou BKVN výrazně liší (Ambalathingal et al., 2017). Detekce viru v moči je velmi citlivá a byla v zahraničních studiích

popsána u 20-75% pacientů, detekce viru v séru pak v 8-50 % pacientů (Brennan et al., 2005; Cinthia B. Drachenberg et al., 2007). Alespoň v jednom odběru byl BK virus detekován v moči nebo séru u 88 % našich pacientů. Na druhou stranu většina pacientů, u kterých byla v našem souboru detekována viremie a/nebo virurie, nerozvinula BKVN a virus dokázala úplně eliminovat. Velké rozdíly v publikovaných výsledcích mohou být dány jak typem použité detekční metodiky (odlišnosti v primerech a zpracování vzorku), tak také odlišností ve sledové populaci (séronegativita/pozitivita, míra imunosuprese) (Kuypers, 2012).

BK virurie $>10^7$ se v naší studii vyskytla u 25,8 %, BK viremie $>10^4$ u 5 % pacientů, tento výskyt dobře koresponduje s výsledky zahraničních monitorovacích studií (Costa et al., 2009; Nickeleit & Mihatsch, 2006; Tong et al., 2016). Stejně jako u jiných autorů (Koukoulaki et al., 2009) byl výskyt BK virurie a BK viremie v našem souboru nejvyšší ve třetím měsíci po Tx.

Histologicky potvrzená diagnóza BKVN byla v našem souboru stanovena u 2,5 % pacientů, což v porovnání se zahraničními studiemi (1-7%) odpovídá průměru. Naopak vysoká korelace naměřených hladin BK viremie s rozvojem BKVN, uváděná některými autory (Cinthia B. Drachenberg et al., 2007), se v našem souboru nepotvrdila. Pouze u jednoho ze šesti pacientů s viremií $>10^4$ byla BKVN potvrzena histologicky. Udává se, že vysoká BK viremie předchází potvrzení BKVN průměrně o 12 týdnů a hladiny viremie korelují se vznikem BKV onemocnění (Hans H Hirsch et al., 2005; Randhawa & Brennan, 2006). Výsledky naší analýzy se v tomto případě liší, dva pacienti měli měřitelnou vysokou viremii až 8 týdnů před diagnózou BKVN a jeden pacient neměl viremii v odběrech před rozvojem BKVN měřitelnou vůbec.

Potvrdili jsme, že limitujícím faktorem absolutní kvantifikace metodou qPCR zůstává definice prahových hodnot BK virurie a viremie se 100% specificitou. Pokyny z roku 2005 doporučují kvantitativní "cut off" pro BKV replikaci v moči $>10^7$ kopií/ml a v séru $>10^4$ kopií/ml (Hans H Hirsch et al., 2005). V naší studii byly stanoveny prahové hodnoty BKV v moči na $6{,}75 \times 10^7$ kopií/ml a v séru na 10^3 kopií/ml. V této studii jsme podobně jako Babel (Babel et al., 2009) prokázali, že trvalá virurie je spojena s rozvojem akutní rejekce.

Za rizikové faktory pro rozvoj BKVN jsou považovány doba studené ischemie, reperfuzní poškození, CMV infekce (Vasudev et al., 2005), míra PRA, čas strávený na dialýze, použití indukční terapie a další (Dall & Hariharan, 2008; Dugan et al., 2006). Analýza klinických a demografických dat pacientů vykazujících $>10^4$ kopií BKV/ml séra a $>10^7$ kopií BKV/ml moči

ukázala, že pacienti se zvýšenou virovou zátěží byli před transplantací delší dobu dialyzováni, měli sníženou funkci štěpu v jednom roce po transplantaci a měli vyšší hodnoty PRA. Nejčastěji zmiňovaným rizikovým faktorem pro rozvoj BKVN je použití imunosupresivní léčby (Koukoulaki et al., 2009). Vyšší výskyt BK virurie a viremie byl v jiných studiích spojován s vlivem udržovací léčby steroidy, terapií thymoglobulinem (Dadhania et al., 2008), vysokými dávkami takrolimu a MMF (Herman et al., 2004). Někteří autoři poukazují na vztah kombinace Tac/MMF ke zvýšené virurii ve srovnání s kombinací CsA/MMF (Brennan et al., 2005; Hans H Hirsch et al., 2005). V našem souboru jsme neprokázali žádné statisticky významné rozdíly v imunosupresivních protokolech u pacientů s BK virurií ani u pacientů s BKVN.

8 STUDIE GENOVÉ EXPRESE

Běžným histologickým nálezem u BKVN je intersticiální zánět. Jeho molekulární podstata nebyla dosud přesně popsána. U 30-80 % pacientů se BK virus během prvního roku po Tx na přechodnou dobu BK virus reaktivuje a následně replikace vymizí (pacienti s bezpříznakovou virurií). Patofyziologie procesu kontroly virové replikace nebyla dosud objasněna. Druhým cílem práce bylo stanovit expresní profil transkriptů spojených s imunitní odpovědí v biopsiích ledvin u pacientů s bezpříznakovou BK virurií a u pacientů s BKVN.

Předpokládali jsme, že ve štěpu ledviny je imunitní odpověď na BK virus měřitelná na úrovni genové exprese.

8.1 Metodika

Pacienti

Pro studium intrarenálních transkriptů byly použity vzorky biopsií ledvin od tří skupin pacientů. První skupinu tvořili **pacienti s bezpříznakovou BK virurií** (AV, n=9). U těchto pacientů byla prokázána přítomnost BK viru v moči vyšší než 10^7 kopií/ml ve třetím měsíci po transplantaci ledviny (v den protokolární biopsie). Žádný z těchto pacientů nerozvinul BKVN a do konce prvního roku po Tx ledviny u všech došlo k vymizení BK viremie i virurie (ve 12. měsíci po transplantaci u nich byla BK viremie i BK virurie nedetekovatelná). Do druhé skupiny byli zařazeni pacienti, u kterých byla biopticky prokázána **BK virová nefropatie** (BKVN, n=10).

Histologické potvrzení BK virové nefropatie bylo definováno jako přítomnost virových cytopatických změn s intranukleárními inkluzemi, poškození renálních tubulárních epiteliálních buněk, včetně přítomnosti epiteliální tubulární nekrózy a obnažení bazálních membrán. Průkaz byl dále doložen pozitivním imunohistochemickým barvením na SV40 LTag.

Do **kontrolní skupiny** (KS, n = 11), byli zařazeni pacienti, kteří měli 1., 3., 6., 9., 12. měsíc vždy negativní výsledky na přítomnost BKV v moči i v séru. Všichni pacienti v kontrolní skupině

měli během dvouletého sledování stabilní funkci štěpu bez rejekce. Základní demografická data jsou uvedena v Tabulce 6.

Tabulka 6. Demografické údaje pacientů ve studii intrarenálních transkriptů

	CG (n=11)	BKVN (n=10)	AV (n=9)	p
Základní údaje				
Věk příjemce (roky)	50 ± 10	44 ± 21	47 ± 10	Ns
Věk dárce (roky)	49,2 ± 13	47 ± 18	46 ± 15	Ns
Žijící dárce (n/%)	1/9	3/30	1/22	Ns
Pohlaví (muži/%)	6/54	3/30	6/66	Ns
Počet HLA neshod	3 ± 1	4 ± 1	2 ± 1	Ns
CMV sérostatus				
D-/R- (n/ %)	1/9%	1/10%	1/11%	Ns
D-/R+ (n/ %)	1/9%	1/10%	1/11%	Ns
D+/R- (n/ %)	3/27%	1/10%	1/11%	Ns
D+/R+ (n/ %)	6/54%	7/70%	6/66%	Ns
Doba dialýzy před Tx ledviny (m)	19 ± 10	27 ± 15	32 ± 26	Ns
Údaje v době biopsie				
Doba od Tx ledviny	94,8 ± 5,8	343 ± 268	85,6 ± 13,5	Ns
BMI (kg/m^2)	23,5 ± 4,8	27,3 ± 4,3	27,2 ± 4,7	Ns
Imunosuprese				
Indukce	36%	50%	44%	Ns
Takrolimus	73%	80%	89%	Ns
Cyklosporin A	27%	0%	0%	Ns
mTOR	18%	40%	11%	Ns
Mofetil-mykofenolát	55%	70%	89%	Ns
Prednison	73%	90%	89%	Ns
Studená ischemie (hodiny)	20 ± 3	13 ± 9	19 ± 3	Ns
Sérový kreatinin (µmol/L)	112 ± 60,3	210 ± 67,2	126 ± 35,3	**

BMI=body mass index; Tx ledviny=transplantace ledviny; **(p<0,01) BKVN versus kontrolní skupina; Ns=nevýznamné

Biopsie štěpu ledvin

Renální biopsie byly získány pod ultrazvukovou kontrolou (Toshiba Power Vision 6000) bioptickou jehlou „14-gauge Tru-Cut“ (Uni-Cut Nadeln, Angiomed, Německo). Většina z ledvinné tkáně byla zpracována pro konvenční histologii. Zbylá část (2 mm) v kortikální

nebo juxtamedulární zóně tkáně ledvin byla okamžitě umístěna do fixačního roztoku RNA later (Ambion Corporation, Austin, Texas), zmrazena a skladována při -80 ° C až do extrakce RNA.

Izolace RNA

Renální tkáň byla homogenizována, celková RNA byla extrahována pomocí StrataPrep RNA Microprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). RNA byla kvantifikována měřením absorbance při 260 nm na spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop Technologies). RNA byla reverzní transkripcí přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí Superscript Reverse transcriptase II (Invitrogen).

RT-qPCR pomocí TaqMan® Low Density Array (TLDA)

Relativní kvantifikace pomocí RT-qPCR byla provedena pomocí Taqman Low Density Array (TLDA, Applied Biosystems). Tato mikrofluidní karta umožňuje kvantitativní hodnocení genů imunitní odpovědi, např. genů pro cytokiny a jejich receptory, HLA molekuly, chemokiny, růstové faktory, imunitní regulátory, povrchové markery imunitních buněk, interleukiny, markery apoptózy a další. Karta dále obsahuje endogenní kontroly. Všechny měřené geny jsou popsány v Tabulce 7. Každá imunitní TLDA karta obsahuje lyofilizované reagencie genové exprese (primery a sondy (FAM značené)) v předkonfigurovaném 384jamkovém formátu.

Na každé kartě byly analyzovány vždy dva vzorky v duplikátech. Každý ze 4 loading portů byl naplněn 100 µl cDNA, vodou ošetřenou proti nukleázám a 2x TaqMan® univerzální PCR master mixem. Po odstředění byly karty uzavřeny pomocí přístroje TLDA sealer (Applied Biosystems, Foster City, CA), aby se zabránilo křížové kontaminaci. RT-qPCR amplifikace byla provedena za použití ABI Prism® 7900 HT Detection Sequence System (Applied Biosystems). Zhodnocení dat RT-qPCR bylo provedeno pomocí softwaru SDS 2.4 (Applied Biosystems) a relativní exprese genů byla stanovena na základě srovnávací metody $2^{-\Delta\Delta}$Ct v programu (RQ) Manager Software v 1.2.1 (Applied Biosystems). Data byla normalizována pomocí vnitřní kontroly, genu GAPDH, jako kalibrátor mezi jednotlivými měřeními pak sloužil vzorek tzv. kontrolní ledviny.

Tabulka 7. Měřené geny

Měřené geny			
IL1A	CD40	GZMB	IL9
18S	CD40LG	HLA-DRA	LRP2
ACE	CD68	HLA-	LTA
ACTB	CD80	HMOX1	MYH6
AGTR1	CD86	ICAM1	NFKB2
AGTR2	CD8A	ICOS	NOS2A
BAX	COL4A5	IFNG	PGK1
BCL2	CSF1	IKBKB	PRF1
BCL2L1	CSF2	IL10	PTGS2
C3	CSF3	IL12A	PTPRC
CCL19	CTLA4	IL12B	REN
CCL2	CXCL10	IL13	RPL3L
CCL3	CXCL11	IL15	SELE
CCL5	CXCR3	IL17	SELP
CCR2	CYP1A2	IL18	SKI
CCR4	CYP7A1	IL1B	SMAD3
CCR5	ECE1	IL2	SMAD7
CCR7	EDN1	IL2RA	STAT3
CD19	FAS	IL3	TBX21
CD28	FASLG	IL4	TFRC
CD34	FN1	IL5	TGFB1
CD38	GAPDH	IL6	TNF
CD3E	GNLY	IL7	TNFRSF18
CD4	GUSB	IL8	VEGF

Druhá set-analýza umožňuje najít geny sdílející společnou ontologii. Pro funkční analýzu byly hodnoty genové exprese zlogaritmovány a porovnány mezi třemi skupinami pomocí ANOVA testu s následnou Bonferoniho korekcí. Analýza byla provedena v programu XGENE.ORG.

Statistická a funkční analýza

U kontinuálních proměnných je uveden medián a variační rozpětí. Studentův T-test a Mann-Whitney U-test byly odpovídajícím způsobem použity pro určení rozdílů parametrických a neparametrických proměnných, vykazujících kvantitativní spojité rozložení. Ke zjištění významnosti rozdílů v čase rejekce byla použita Kaplan-Meierova analýza. Statistická analýza byla provedena v programu Graph Pad Prism Version 4.0. Pomocí statistického programu

SigmaPlot Version 11.0 byla vytvořena ROC (Receiver Operating Characteristic) křivka pro stanovení hraničních hodnot BK viremie a virurie pro vznik BKVN.

K hodnocení intrarenální exprese bylo použito hierarchické klastrování pomocí softwaru MeV(V.3), který umožňuje vizualizaci výsledků. Vstupními daty byly mediány logaritmovaných hodnot relativní kvantifikace (RQ) jednotlivých vzorků. Byla použita klasifikační metoda, kde známým vstupem bylo zařazení konkrétního vzorku do skupiny. Podobnost je na obrázku vyjádřena hierarchickým stromem – dendrogram s teplotní mapou „heat-map“.

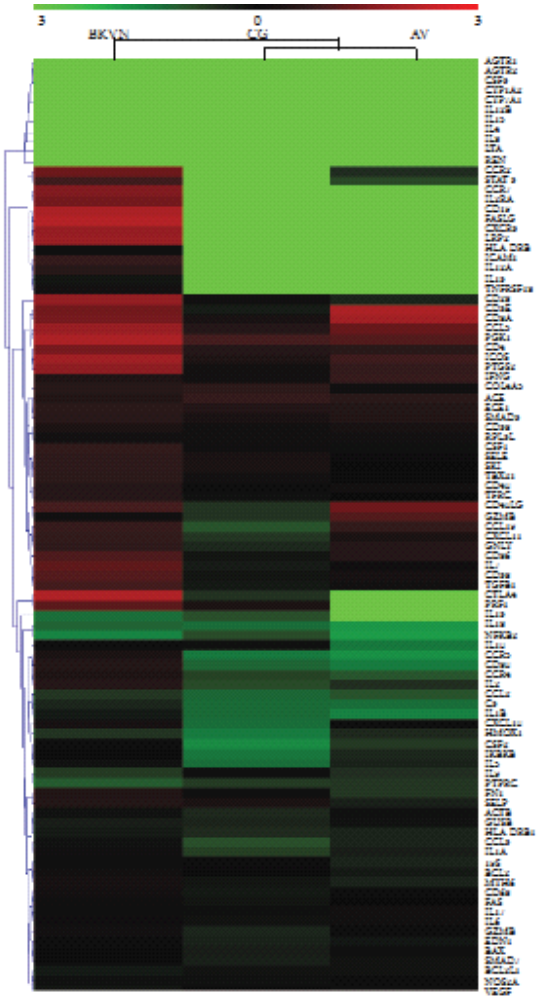
Získaná data byla dále postoupena funkční analýze. Vzhledem k tomu, že byl hodnocen vyšší počet genů, byla využita set-analýza pomocí přístupu „large-scale data management“, vhodného k identifikaci konkrétních transkripčních vzorů. Byly využity 2 typy funkční analýzy:

První metodou byla metoda tzv. fluxů (FCF, fully coupled flux), která umožnuje sledovat rozdíly v expresi genů mezi skupinami nejen na úrovni jednotlivých genů, ale také na úrovni fragmentů známých biologických drah. Geny spojené do fluxů mají podobné expresní vzorce, sdílejí transkripční regulátory a často jsou součástí stejného operonu.

8.2 Výsledky

Genový expresní profil

Nejprve jsme zjišťovali, zda se jednotlivé skupiny liší v expresním profilu všech 90 měřenýchgenů. Pomocí hierarchického klastrování byly porovnány expresní profily mezi sledovanými skupinami. Hierarchické klastrování ukázalo, že transkripční profil pacientů s bezpříznakovou virurií byl podobný jako profil pacientů v kontrolní skupině. Nicméně, transkripční profil u pacientů s BK virovou nefropatií se podstatně lišil (Obrázek 10).



Obrázek 10. Hierarchické klastrování 3 sledovaných skupin.
Na „heat map" je zobrazeno všech 90 sledovaných genů (plus endogenní kontroly). Ke konstrukci této mapy byly použity mediány logaritmovaných hodnot relativní kvantifikace sledovaných genů. Červená barva označuje geny s relativně zvýšenou expresí a zelená geny s relativně sníženou expresí.

Intrarenální transkripční profil pacientů s bezpříznakovou BK virurií

Abychom mohli určit povahu imunitních mechanismů spojených s kontrolou BKV infekce, porovnali jsme transkripční profil ve vzorcích ledvin pacientů s bezpříznakovou virurií a pacientů v negativní kontrolní skupině.

Exprese pěti genů vykazovala statisticky významný rozdíl. Rozdíl byl nalezen u genu *CD3E*, ukazujícího na zvýšenou přítomnost T-buněk, dále genu pro *CD68*, povrchového markeru makrofágů, dále genu pro *CCR2* (chemokin, který specificky zprostředkovává chemotaxi monocytů) a adhezní molekulu *ICAM-1*. Exprese genu pro *SKI* protoonkogen, zapojený do downregulace TGF-β1, byla u pacientů s bezpříznakovou virurií významně snížena (Tabulka 8).

Tabulka 8. Geny s rozdílnou aktivitou u pacientů s bezpříznakovou virurií

gen	Kontrolní skupina	Bezpříznaková virurie	p
CCR2	0 (0-6,38)	0,3 (0-31,7)	0,02
CD3E	0,53 (0,03-37,3)	117 (0,15-1120)	0,04
CD68	0,61 (0,05-1,38)	1,15 (0,72-4,96)	0,04
SKI	2,32 (0,29-13,2)	0,47 (0,07-13)	0,04
ICAM1	0,03 (0-0,08)	0,34 (0,02-2,12)	0,05

Data zobrazena jako medián (minimum-maximum).

Funkční analýza ukázala, že pacienti s bezpříznakovou virurií vykazovali významně vyšší hladiny exprese genů pro flux CD40/CD40L, který je významným kostimulačním signálem.

Dále byla provedena analýza pomocí seskupení genů s podobnou expresí, které mají společnou ontologii. Tato analýza odhalila několik biologických procesů, které mohou být zapojeny do imunitní kontroly BKV. Těmito procesy jsou proliferace B lymfocytů (BCL2, CD40,CD40L, IL-10), T buněčná proliferace (CD28, CD3E, IL12A, IL-4, PTPRC), proteolýza (ACE, ECE1, GZMB, LTA, REN), antiapoptotické procesy (BCL2, BCL2L, CCL2, CD40L, FAS, IL-10, IL1A), adheze leukocytů (CD40L, ICAM-1) a další viz (Tabulka 9).

Tabulka 9. Biologické procesy asociované s bezpříznakovou BK virurií.

GO term		Anotované geny	p
soluble fraction	GO:0005625	ACTB, CCL3, CCR2, CD40LG, FAS, IL13,SELP	0,0296
B lymphocyte proliferation	GO:0042100	BCL2, CD40, CD40LG, IL10	0,0364
transmembrane receptor tyrosinekinase pathway	GO:0007169	CD4,CD8A,FN1	0,0394
proteolysis	GO:0006508	ACE,ECE1,GZMB,LTA,REN	0,0416
protein kinase binding	GO:0019901	CD3E,CD4,PTPRC	0,0426
platelet activation	GO:0030168	CD40,CD40LG	0,0428
positive regulation of T cell proliferation	GO:0042102	CD28,CD3E,IL12A,IL4,PTPRC	0,0444
anti-apoptosis	GO:0006916	BCL2,BCL2L1,CCL2,CD40LG,FAS,IL10,IL1A, 'IL1B','IL2','TNF','TNFRSF18	0,0466
leukocyte cell-cell adhesion	GO:0007159	CD40LG,ICAM1	0,0466
T cell receptor complex	GO:0042101	CD3E,CD4,CD8A ['CD3E','CD4','CD8A'])	0,0484

p hodnoty byly vypočteny použitím testu ANOVA následovaným Bonnferroniho korekcí.

Intrarenální transkripční profil pacientů s BKVN

Oproti kontrolní skupině vykazovala skupina BKVN odlišnou expresi 33 z 90 měřených genů. Tyto geny jsou shrnuty v Tabulce 10. Funkční analýza ukázala, že pacienti s BKVN měli významně vyšší hladiny exprese fluxu pro FasL/FAS ($p < 0,05$) a pro signální molekuly CD28, CD80, CD86 ($p < 0,05$), které jsou spojovány s apoptózou a kostimulací. Kromě toho, analýza seskupení genů s podobnou expresí a stejnou ontologií odhalila mnoho biologických procesů, které jsou aktivní při BKVN (Tabulka 10).

Tabulka 10. Geny s rozdílnou aktivitou u pacientů s BKVN

geny	kontrolní skupina	BKVN	p
C3	0,06(0,02-0,6)	0,375(0,03-5,27)	0,022
CCL2	0,06 (0,01-0,12)	0,22 (0,03-0,85)	0,005
CCL3	0,12 (0-0,65)	0,71(0,16-5,89)	0,02
CCL5	3,26(0,41-45,4)	66,9(7,9-235)	0,003
CCR2	0(0-6,38)	20,7(0-158)	0,001
CCR7	0(0-659)	35,3(0-789)	0,017
CD19	0(0-104)	109(0-2440)	0,013
CD28	1,36(0-75,1)	59,3(0,74-448)	0,012
CD4	3,32(0,22-15,1)	27(6,63-209)	0,004
CD68	0,61(0,05-1,38)	1,68(0,97-4,79)	0,001
CD86	0,67(0,01-16,9)	10(0,88-32,3)	0,012
CSF1	1,42(0,02-4,89)	5,17(0,57-71,3)	0,049
CXCL10	0,05(0-2,9)	1,8(0,06-3,76)	0,015
CXCR3	0(0-34,3)	61,2(0-671)	0,013
EDN1	0,45(0,14-1,32)	1,18(0,39-8,74)	0,025
FASL	0(0-67,2)	145,72(25,96-409,25)	0,003
GNLY	0,36(0,12-2,1)	4,9(1,45-52,2)	0,001
HLADRA	0,39(0,15-3,27)	1,55(0,503-7,6)	0,021
HLA-DRB1	0(0-0,39)	0,85(0-85,6)	0,036
ICAM1	0,03(0-0,8)	0,235(0,06-13,1)	0,03
IFNG	2,65(0-139)	82,1(0-519)	0,023
IL12B	0(0-3,83)	3,49(0-37,6)	0,03
IL1B	0,17(0-0,95)	1,38(0,3-3,67)	0,002
IL2RA	0,14(0-3,44)	3,32(0,47-19)	0,009
IL6	0,05(0,01-3,49)	0,72(0,07-9,49)	0,048
IL8	0,55(0-6,75)	14,7(0,11-53,4)	0,004
LTA	0(0-93,9)	68,8(0-903)	0,036
PRF1	8,7(0-43,3)	117(1,4-4100)	0,007
PTPRC	1,52(0,55-24,6)	47,6(4,7-303)	0,001
TBX21	0(0-15,2)	7,14(0-383)	0,036
TGFB	0,73(0,23-6,75)	3,42(0,73-13)	0,025
TNF	0,61(0,04-3,18)	8,2(0,95-30,7)	0,002
TNFRSF18	0(0-1,77)	1,7(0-19,5)	0,01

Data jsou zobrazena jako medián (minimum-maximum).

Tabulka 11. Biologické procesy aktivní při BKVN

GO term		Anotované geny	p
angiogenesis	GO:0042056	CCL3,CCL5	0,013
induction of positive chemotaxis	GO:0001525	IL18,IL1B,IL8,VEGF	0,013
regulation of cell adhesion	GO:0050930	IL8,VEGF	0,015
regulation of isotype switching	GO:0030183	IL10,IL4	0,015
regulation of cell adhesion	GO:0045191	IL10,IL4	0,015
response to oxidative stress	GO:0030155	ICAM1,IL18,IL8	0,016
protein phosphorylation	GO:0006979	CCL5,PTGS2	0,016
positive regulation of T helper 2 cell differentiation	GO:0006468	CCL2,IKBKB,TGFB1	0,017
cellular component movement	GO:0045630	CD86,IL6	0,018
positive regulation of B cell proliferation	GO:0006928	ACTB,CCL3,CCL5,CXCR3,IFNG,IL13,IL8, PTGS2,STAT3	0,019
cellular calcium ion homeostasis	GO:0030890	IL4,IL7,PTPRC	0,019
chemokine activity	GO:0006874	CCL19,CCL2,CCL3,CCL5	0,022
response to glucocorticoid stimulus	GO:0008009	CCL19,CCL2,CCL3,CCL5,CXCL10,CXCL11,IL8	0,024
positive regulationof T cell proliferation	GO:0051384	IL10,IL6,TNF	0,024
T cell differentiation	GO:0042102	CD28,CD3E,IL12A,IL4,PTPRC	0,024
defense response to virus	GO:0030217	IL2,PTPRC	0,025
induction of apoptosis	GO:0051607	BCL2,PTPRC	0,026
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0008624	CD38,FAS,FASLG	0,027
positive regulation of protein kinase activity	GO:0000122	SMAD3,STAT3,TNF	0,030
response to virus	GO:0045860	CD4,PTPRC	0,033
negative regulation of cytokine secretion	GO:0009615	CCL19,CCL5,IFNG,TNF	0,033
negative regulation of interleukin-6	GO:0002740	IL10,TNF	0,033

receptor biosynthetic process	GO:0032715	IL10,TNF	0,033
positive regulation of cytokine production	GO:0032800	IL10,TNF	0,033
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0050715	IL10,TNF	0,033
positive regulation of isotype switching to IgG isotypes	GO:0045944	IL4,IL6,SMAD3,TNF	0,034
regulation of immune response	GO:0048304	IFNG,IL4,TBX21	0,035
activation of caspase activity	GO:0050776	IFNG,IL4,TBX21	0,035
receptor binding	GO:0006919	BAX,SMAD3,TNF	0,035
antigen processing and presentation	GO:0005102	C3,REN	0,038
activation a pro-apoptotic gene products	GO:0019882	CD8A,IFNG	0,038
cell cycle arrest	GO:0008633	BCL2,FAS,FASLG	0,039
protein kinase binding	GO:0007050	IFNG,IL12A,IL12B,IL8,SMAD3,TGFB1	0,042

8.3 Diskuse

V této studii jsme studovali expresní profil u dvou skupin pacientů s různým stupněm BKV infekce. První skupinu tvořili pacienti s bezpříznakovou BK virurií, s normální funkcí štěpu, u nichž v tříměsíční biopsii histologické vyšetření nepotvrdilo žádné poškození štěpu. V těchto vzorcích jsme přesto prokázali změnu v expresi 5 genů: geny pro CD3E, CD68, CCR2 a ICAM-1 měly expresi zvýšenou, gen SKI sníženou oproti kontrolní skupině. Protože se u těchto pacientů nikdy nerozvinula BK virová nefropatie, předpokládáme, že exprese těchto genů odráží kontrolu BK virové replikace imunitním systémem příjemce. Pro hlubší pochopení imunitních dějů jsme naše výsledky dále porovnali pomocí funkční analýzy.

Druhou skupinu tvořily vzorky biopsií od pacientů s prokázanou BK virovou nefropatií. V době vzniku této práce existovalo pouze omezené množství informací o molekulárních procesech spojených s BK virovou nefropatií. V souladu s výsledky jiných studií (Hoffmann et al., 2005; R. B. Mannon et al., 2005; Roslyn B. Mannon & Kirk, 2006) jsme u pacientů s BK nefropatií identifikovali 33 genů, jejichž exprese se lišila od kontrolní skupiny. Imunitní odpověď měřená na úrovni genové exprese při poškození ledviny BKVN zahrnovala zejména

CD4+ lymfocyty (P. Comoli, Binggeli, Ginevri, & Hirsch, 2006; Lamarche et al., 2016; Mueller et al., 2011), efektorové molekuly TNF, GNLY (granulosin), IFN-γ, CD68+monocyty, chemokiny a jejich receptory (CCL2/CCR2), což naznačuje, že tyto buňky mohou hrát důležitou roli v progresi BKVN. Některé studie prokázaly zapojení humorální imunity v patogenezi BKVN (Patrizia Comoli et al., 2013; Egli et al., 2009; Li et al., 2013), v naší studii jsme nalezli významně zvýšenou expresi genu pro znak CD19, značící přítomnost B lymfocytů.

Pomocí funkční analýzy jsme dále popsali biologické procesy probíhající v ledvinách postižených BKV nefropatií. Identifikovali jsme 28 možných biologických procesů, které se mohou podílet na vzniku BKV nefropatie. Jejich interpretace je jistě složitá, nicméně lze zjistit některé zjevné rozdíly. Za zajímavý nález považujeme aktivaci dráhy apoptózy u pacientů s BKVN, zatímco u pacientů s asymptomatickou BK virurií je tato dráha inhibována.

9 OBSERVAČNÍ STUDIE

V poslední, observační studii, jsme se zaměřili na klinické zhodnocení BKV infekce a BKVN v IKEM za období 2009-2018. Cílem bylo vyhledat pacienty s BK viremií vyšší než 10^4 kopií/ml a pacienty s BKVN a sledovat incidenci, přežití štěpů a léčbu u těchto pacientů. Tato data zatím nebyla publikována. Předpokládali jsme, že dlouhodobé výsledky štěpů od pacientů s BK viremií/BKVN jsou horší než u štěpů u pacientů bez BK viremie/BKVN.

9.1 Metodika

Pacienti

110 pacientů mělo v některém z odběrů **viremii více než 10^4 kopií/ml plazmy.** Bylo identifikováno **96 pacientů po izolované transplantaci ledviny, u kterých byla BKVN** histologicky potvrzena v letech 2009-2018 (68 mužů a 28 žen). Počet pacientů s histologicky potvrzenou BKVN v jednotlivých letech je uveden v Tabulce 12. Jako kontrolní data byly použity údaje od všech pacientů, kteří podstoupili izolovanou transplantaci ledviny, byli léčeni na klinice nefrologie IKEM v letech 2008-2018 a neměli diagnostikovánu BKVN/viremii více než 10^4 kopií/ml plazmy (n=2058/n=2072) pacientů.

Tabulka 12. Počet pacientů s biopticky potvrzenou BKVN v letech 2009-2018

Rok diagnózy	Počet BKVN (n=96)
2018	9
2017	7
2016	8
2015	10
2014	14
2013	12
2012	10
2011	9
2010	10
2009	7

Sledování BKV infekce

V 2009 zavedla laboratoř lékařské genetiky IKEM stanovení počtu kopií BK viru. K vyšetření je použita plazma, stanovení počtu kopií je provedeno pomocí kitu RealStar® BKV PCR Kit 1.0 (Altona diagnostics, Německo) a přístroje Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, UK). U všech pacientů je BK viremie vyšetřována mezi druhým a třetím měsícem po Tx ledviny a při zhoršení funkce štěpu s nejasnou příčinou.

Stanovení BKVN

U všech pacientů je ve třetím měsíci po transplantaci provedena protokolární biopsie štěpu ledviny. Dále je biopsie prováděna u pacientů vždy při poklesu funkce štěpu s nejasnou příčinou. Histologické potvrzení BKVN je prováděno dle Banffské klasifikace (Roufosse et al., 2018).

Imunosupresivní protokol pacientů

Před transplantací obdrží pacienti s PRA >20 % indukční terapii (rATG, daklizumab, basiliximab). Všem je podán methylprednisolon. Po Tx mají pacienti udržovací léčbu, nejčastěji trojkombinaci takrolimus/cyklosporin A + MMF + kortikosteroidy. Vzácně je použit mTOR inhibitor.

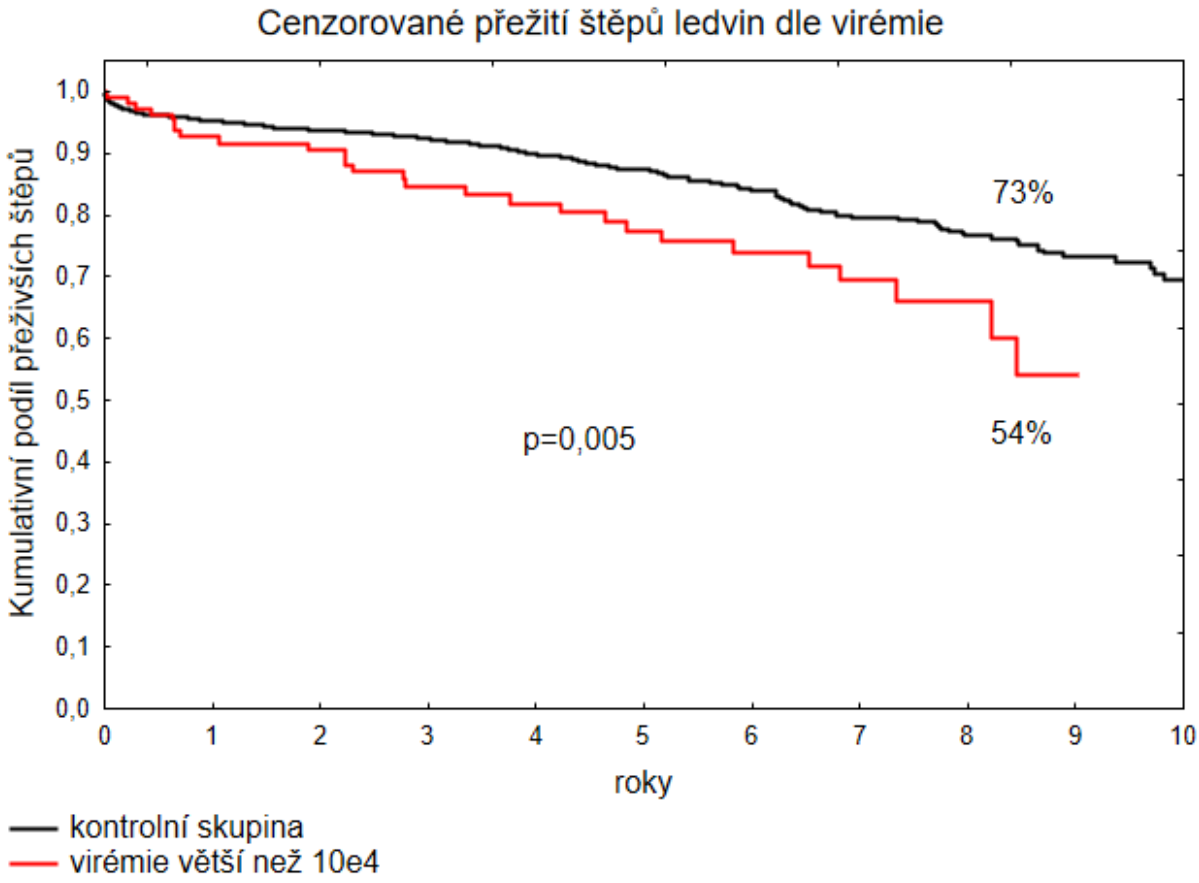
Statistická analýza

Ke zpracování dat byl použit program Statistica verze 12 (StatSoft inc.). Výsledky jsou interpretovány jako medián (min-max) a průměr (± SD), pokud není uvedeno jinak. Parametrická data v jednotlivých skupinách byla porovnána pomocí $\chi 2$ testu, Fisherova exaktního testu. U neparametrických dat byl použit Mann-Whitney U test nebo Kruskal-Wallis test podle počtu testovaných skupin. Byly vytvořeny Kaplan-Meierovy křivky přežití s rozdílem mezi křivkami hodnocenými pomocí log-rank testu.

9.2 Výsledky

Pacienti s BK viremii >10^4

BK viremie >10^4 byla v letech 2009-2018 stanovena u 110 pacientů. U 62 (56 %) z těchto pacientů byla histologicky potvrzena BKVN. Kumulativní přežití pacientů s viremií vyšší >10^4 se nelišilo od pacientů, kteří měli viremii nižší. Obdobně se nelišilo ani necenzorované přežití štěpů ledvin. Přežití štěpů ledviny (cenzorované na úmrtí pacienta) u pacientů s viremií vyšší než 10^4 bylo významně horší (73 % vs 54 %, p=0,005) než u ostatních pacientů bez významné viremie (Obrázek 11.).



Obrázek 11. Cenzorované přežití štěpů ledvin u pacientů s viremií >10^4 v porovnání s kontrolní skupinou štěpů od pacientů transplantovaných v letech 2008-2018

Demografická data pacientů s/bez viremie $>10^4$ jsou uvedena v Tabulce 14. Porovnání demografických údajů mezi pacienty s/bez viremie$>10^4$ ukázalo, že mezi skupinami nebyl významný rozdíl v žádném ze sledovaných údajů (p>0,05).

Tabulka 13. Demografická data pacientů s/bez BK viremie $>10^4$

Skupina	BK viremie $>10^4$(n=110)	kontrolní (n=2058)	P
Věk (roky)	54±13	52±14	Ns
Pohlaví (muži, %)	57 (52%)	1167 (57%)	Ns
Věk dárce (roky)	52±14	51±14	Ns
Žijící dárce (počet, %)	14 (13%)	385 (18%)	Ns
CIT (hodiny)	13±6	13±7	Ns
Průměrná doba na HD (roky±SD)	2,4±1,5	2,6±2,1	Ns
HLA neshody			
0-2	31(28%)	549(27%)	
3-4	58(52%)	1165(56%)	
5-6	21(19%)	340(17%)	
První štěp (n, %)	94(85%)	1738 (84%)	Ns
Nejvyšší PRA ≥80% (n,%)	9 (8%)	140 (7%)	Ns

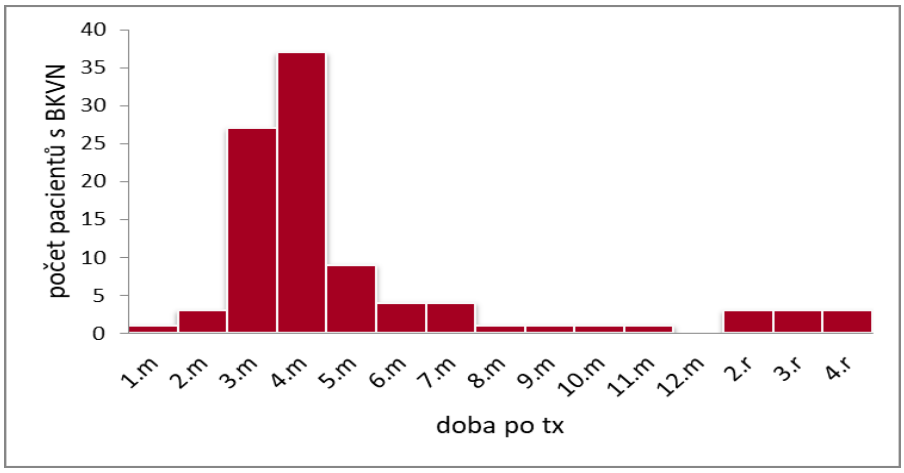
Pacienti s BKVN

Incidence BKVN podle roku transplantace je uvedena v Tabulce 14.

Tabulka 14. Incidence BKVN dle roku Tx

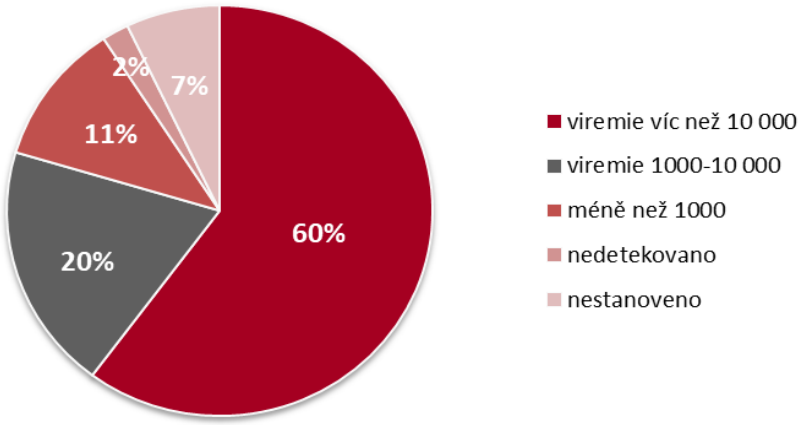
Rok transplantace	Počet BKVN (n, %)	Počet všech Tx pacientů
2009	7 (4%)	173
2010	10 (5,9%)	169
2011	9 (5,3%)	170
2012	10 (5,1%)	195
2013	12 (5,2%)	229
2014	14 (6,4%)	220
2015	10 (4,6%)	216
2016	8 (3,7%)	214
2017	7 (3,5%)	200
2018	9 (4,5%)	199

Na obrázku 12 jsou počty pacientů s biopticky potvrzenou BKVN v čase od Tx. Medián diagnózy BKVN byl 101 dnů (10-1463) po Tx ledviny. Nejčastěji, a to v 69 (72 %) případech, byla BKVN diagnostikována v protokolární biopsii, která je v našem centru prováděna mezi 2. -4. měsícem po Tx ledviny. Průměrný věk pacientů v době diagnózy byl 54±14 let.



Obrázek 12. Počty pacientů s biopticky ověřenou BKVN v závislosti na čase od transplantace.

Viremie v době diagnózy BKVN. 58 (60 %) vykazovalo viremii více než 10^4. U 18 pacientů (20 %) se viremie pohybovala mezi 10^3 a 10^4. U 11 pacientů (11 %) byla naměřena viremie méně než 10^3. U 2 pacientů nebyl virus detekován v době diagnózy. Sedm pacientů nemělo viremie v době diagnózy BKVN vyšetřenou.



Obrázek 13. Viremie v době diagnózy BKVN.

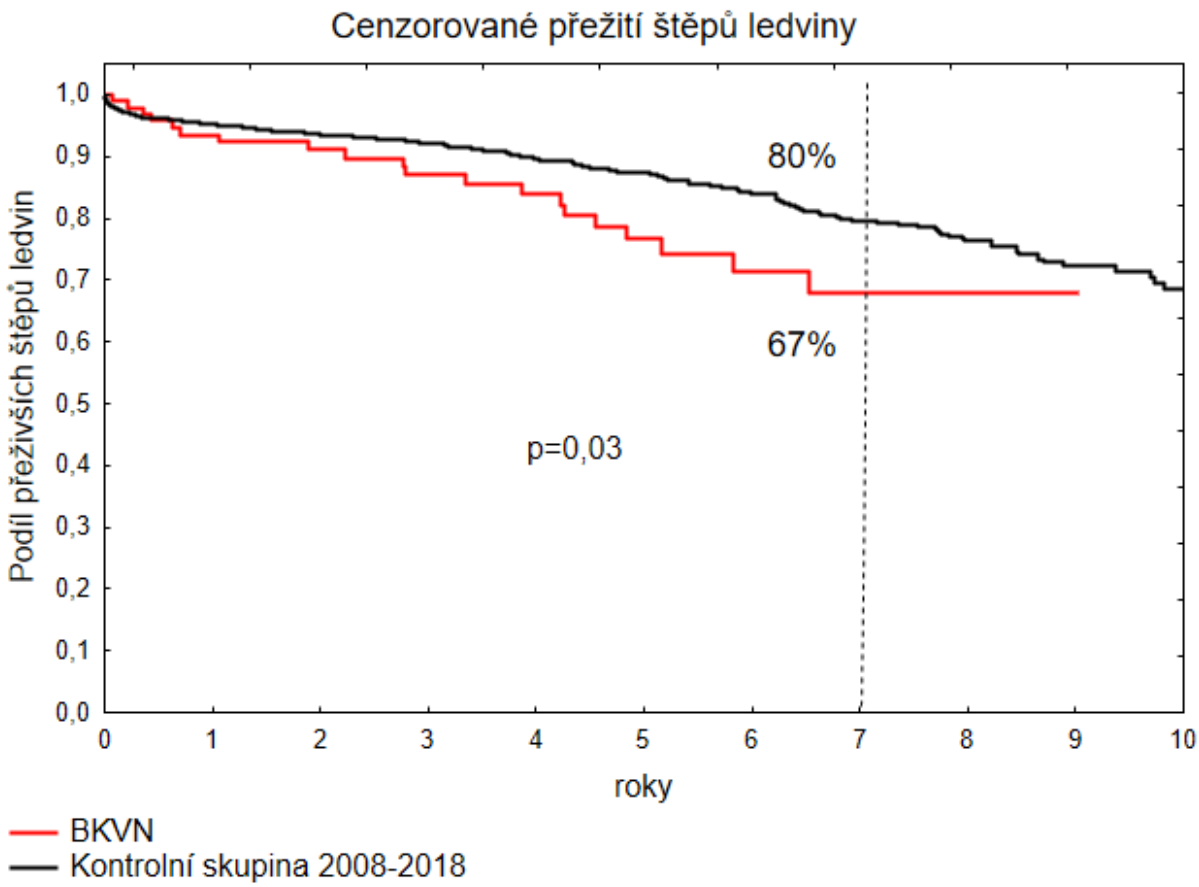
Základní demografické údaje pacientů s BKVN (n=96) byly porovnány s údaji od všech pacientů s izolovanou Tx ledviny, léčených na KN IKEM v letech 2008-2018 (n=2072) viz Tabulka 15.

Tabulka 15. Demografická data pacientů s BKVN

Skupina	BKVN (n=96)	kontrolní (n=2072)	P
Věk (roky)	53±14	52±13	Ns
Pohlaví (muži, %)	54(56%)	1181(57%)	Ns
Věk dárce (roky)	54±14	51±14	Ns
Žijící dárce (počet, %)	12(12%)	337(18%)	Ns
CIT (hodiny)	14±6	13±7	Ns
Průměrná doba na HD (rok,SD)	2,8±2,0	2,6±2,1	Ns
HLA neshody			Ns
0-2	27(28%)	552(26%)	
3-4	48(50%)	1175(56%)	
5-6	21(22%)	345(17%)	
První štěp (n, %)	76(79%)	1755(84%)	Ns
Nejvyšší PRA ≥80% (n,%)	10(10,4%)	139(7%)	Ns

Přežití štěpu s BKVN. Selhání štěpu bylo definováno jako nutnost návratu na dialýzu. Štěpy od pacientů s BKVN (n=96) měly výrazně horší přežití (p=0,003) než štěpy bez BKVN (n=2072) (Obrázek 14.). Ke ztrátě štěpu došlo u 19 pacientů, medián selhání byl 1092 dnů (39-2262) od diagnózy BKVN. U 6 pacientů došlo k úmrtí s funkčním štěpem.

Rizikové faktory ztráty štěpu BKVN. Jako významný prediktor selhání štěpu s diagnózou BKVN se ukázala hladina kreatininu v době diagnózy BKVN, viremie v době diagnózy, pohlaví dárce a maximální hladina PRA. Všechny sledované údaje jsou shrnuty v Tabulce 16. Do multivariantní analýzy byly zahrnuty tři faktory (kreatinin v době diagnózy, BK viremie v době diagnózy a ženské pohlaví dárce). Jako významný rizikový faktor vyšlo pohlaví dárce – žena a kreatinin v době diagnózy. Ženské pohlaví zvyšuje riziko selhání 5,9krát a zvýšení kreatininu o jednotku 4,5krát. Přítomnost obou faktorů současně u pacientů s BKVN predikuje selhání štěpu ledviny v cca 64%. Selhání štěpu při BKVN není závislé na typu použité léčby.



Obrázek 14. Cenzorované přežití štěpů ledvin u pacientů s BKVN oproti všem ostatním transplantovaným pacientům v letech 2008-2018.

Použitá léčba. Prvním terapeutickým krokem při potvrzené diagnóze BKVN je změna nebo snížení imunosuprese. Imunosuprese byla modifikována u všech 96 s BKVN. U 86 pacientů byla prvním terapeutickým zásahem změna kalcineurinových inhibitorů z takrolimu na cyklosporin A u 3 pacientů šlo o změnu z kalcineurinových inhibitorů na mTOR inhibitory, u 3 pacientů o snížení dávek Tac na polovinu, u 4 pacientů pouze o redukci MMF.

Z dalších preparátů byly pro léčbu použity fluorochinolony a to ve 40 případech, cidofovir byl podán v 18 případech a intravenózní imunoglobuliny byly podány v 14 případech.

Retransplantace po BKVN. Ke ztrátě štěpu došlo u 19 (19 %) pacientů, kteří prodělali BKVN. U dvou (10 %) byla úspěšně provedena retransplantace (u jednoho po předchozí grafektomii). Oba pacienti jsou pravidelně sledováni na replikaci BK viru. Dalších 6 pacientů je zařazeno na čekací listinu (všech 6 po grafektomii). U 3 pacientů došlo k úmrtí. Zbylých 8 pacientů není zařazeno na čekací listinu, ani nepodstoupili retransplantaci.

Tabulka 16. Demografická data BKVN pacientů se selhaným/neselhaným štěpem ledviny

Faktory	Selhaný štěp (n=19)	Neselhaný štěp (n=77)	p
Pohlaví příjemce – ženy	5	23	Ns
Typ dárce (žijící/kadaverózní)	3/14	7/69	Ns
Věk dárce	51 ± 15	53 ± 14	Ns
Pořadí transplantace	2/15	17/61	Ns
Pohlaví dárce - ženy	12	20	0,01
Věk příjemce	46±15	55±14	Ns
BKV viremie	281 698 ± 462 063	234 132 ± 771 623	0,04
S_{kreat} µmol/l v době dg	232 ± 112	173 ± 80	0,05
PRA max	14 ± 15	27 ± 30	0,02
HLA neshody	3.2 ± 1.5	3.2 ± 1.3	Ns
Doba na dialýze	3.1 ± 3	2.7 ± 1.8	Ns
Doba studené ischemie	13.2 ± 6.9	13.9 ± 6.4	Ns
BKVN grade			Ns
A	4	17	
B	9	44	
C	0	10	
Léčba			
Konverze takrolimus na cyklosporin	14	69	Ns
Konverze takrolimus na mTORi	1	3	Ns
IVIG	1	14	Ns
Redukce denní dávky MMF	4	14	Ns
Ciprofloxacin	7	34	Ns
Cidofovir	3	15	Ns

9.3 Diskuse

Vyšetření BK viremie se u pacientů po transplantaci ledviny v IKEM provádí od roku 2009 pravidelně, proto v současné době máme k dispozici jedinečná data z dlouhodobého sledování. V této studii, jsme retrospektivně hodnotili dlouhodobé přežití štěpů ledviny u pacientů, kteří měli buď významnou viremii nebo histologicky potvrzenou BKVN.

Zajímavým výsledkem je, že přežití štěpů ledviny cenzorované na úmrtí bylo významně horší jak u příjemců s BKVN, tak u příjemců, u kterých byla zachycena významná BK viremie $>10^4$ (Elfadawy et al., 2014). Přesto, že v literatuře je uváděno mnoho rizikových faktorů vzniku BKV infekce a BKVN po transplantaci ledviny (Sawinski & Goral, 2014), naše analýza

neprokázala žádný rozdíl v demografických údajích od pacientů s vysokou viremií/s BKVN oproti pacientům bez viremie/bez BKVN.

Vypočtená incidence pohybující se mezi 3,7-6,4% BKVN v letech 2009-2018 je srovnatelná s incidencí udávanou v zahraničních studiích (Elfadawy et al., 2014; Hsiao, Pilmore, Zhou, & de Zoysa, 2016). Důležitým poznatkem je, že uváděná riziková hodnota viremie 10^4 kopií/ml může podhodnocovat diagnózu nefropatie. Naše výsledky ukazují, že až 35 % pacientů může mít BKVN bez zjištěné významné viremie, což koresponduje s výsledky z jiných center (Hassan et al., 2014). Stejně tak i samotné vyšetření s nálezem významné viremie často nevede k histologickému potvrzení BKVN. V tomto ohledu se naše výsledky shodují s výsledky prof. Hirsche, který uvádí, že viremie vyšší než 10^4 má pouze 30-50 % prediktivní hodnotu odhalení BK virové nefropatie histologickým vyšetřením (H H Hirsch, Randhawa, & Hirsch, 2013). Podobně jako ve studii Parka (W. Y. Park et al., 2018), byla prognóza štěpu výrazně horší u pacientů, kteří měli v době diagnózy BKVN vyšší sérový kreatinin, vyšší hodnotu BK viremie, měli dárce ženského pohlaví a maximální hodnotu PRA vyšší než pacienti v kontrolní skupině.

Léčebná strategie u prokázané formy BK virové nefropatie nebyla dosud ověřena ve velkých randomizovaných studiích. Pro nedostatek validních dat z velkých randomizovaných studií se postupy mezi centry mohou lišit, nicméně redukce imunosupresivní léčby zůstává standardem. V klinické praxi se často používají i jiné léky a postupy, například fluorochinolony, cidofovir, léčba lidským intravenózním imunoglobulinem či konverze na léky ze skupiny mTOR inhibitorů (Ambalathingal et al., 2017). Úspěch léčby je obvykle definován vymizením viremie. V naší skupině jsme nenalezli rozdíl v použité léčbě mezi pacienty se selhaným a neselhaným štěpem.

10 ZÁVĚR

V předkládané disertační práci jsou shrnuty výsledky tří studií zaměřených na BK virovou infekci u pacientů po transplantaci ledviny.

1. ***Prvním cílem této práce bylo zavést monitoraci BK virové replikace u pacientů po transplantaci ledviny v IKEM, stanovit hraniční hodnoty BK viremie a virurie pro rozvoj BKVN a zhodnotit rizikové faktory pro rozvoj BKVN.***

V naší laboratoři byla zavedena metodika absolutní kvantifikace RT-qPCR. Během dvou let bylo analyzováno 1243 vzorků od 120 pacientů (622 z moči a 621 ze séra). Pozitivní BK virurie $>10^7$ kopií/ml a pozitivní BK viremie $>10^4$ kopií/ml se vyskytla u 25,8% a 5%; respektive. U 3/120 sledovaných pacientů došlo k rozvoji BKVN. U žádného z pacientů nedošlo ke ztrátě štěpu v důsledku BKVN. Pacienti s pozitivní viremií byli déle dialyzováni a měli vyšší hladiny PRA. Pacienti s trvalou virurií měli více rejekčních epizod než pacienti s přechodnou virurií. Pomocí ROC analýzy byly stanoveny hraniční hodnoty pro rozvoj BKVN na 10^3 kopií/ml séra pro BK viremie a $6{,}7 \times 10^7$ kopií /ml pro virurii.

2. ***Druhým cílem bylo stanovit expresní profil imunitních genů v biopsiích ledvin ve dvou skupinách pacientů s různým stupněm reaktivace BK viru (s bezpříznakovou virurií, BKVN) a hledat markery úspěšné kontroly BK virové replikace na molekulární úrovni.***

V této části jsme využili techniku popisu bioptického nálezu na molekulární úrovni. Bylo měřeno 90 genů imunitní odpovědi metodou TaqMan® low density array RT-qPCR. Druhá studie prokázala, že bezpříznaková BK virurie se odráží v aktivitě genů spojených s imunitní odpovědí v transplantované ledvině. Analýza biopsií pacientů s bezpříznakovou virurií identifikovala 5 rozdílně exprimovaných genů (CD3E, CD68, CCR2, ICAM-1, SKI; $p<0{,}05$), funkční analýza ukázala významně zvýšenou přítomnost kostimulačního signálu (CD40/CD40L; $p<0{,}05$).

Analýza biopsií od pacientů s BKVN vedla k identifikaci 33 rozdílně exprimovaných genů, odrážejících silnou imunitní reakci, která probíhá ve štěpech s BKVN. Funkční analýza ukázala, že pacienti s BKVN měli významně vyšší hladiny exprese pro FasL/FAS ($p < 0{,}05$) a pro signální molekuly CD28, CD80, CD86 ($p < 0{,}05$), které jsou spojovány s apoptózou a kostimulací.

Měření exprese mRNA ve vzorcích biopsií štěpů ledvin poskytlo detailnější informace o patofyziologii imunitní kontroly BKV infekce.

3. ***Třetím cílem této práce bylo retrospektivně zhodnotit incidenci, rizikové faktory, použitou léčbu a dlouhodobé výsledky u pacientů s BK viremií >10^4 kopií/ml a BKVN a v IKEM v letech 2009-2018***

Incidence BKVN v letech 2009-2018 se pohybovala mezi 3,5-6,4 % pacientů po izolované transplantaci ledviny. Přežití štěpů ledviny cenzorované na úmrtí bylo významně horší u pacientů s viremií >10^4 i u pacientů s BKVN. Věk dárce, věk příjemce, doba na dialýze, doba studené ischemie ani typ a pořadí transplantace nebyly rizikovými faktory pro vznik BKV infekce a BKVN ($p>0,05$). Porovnání mezi BKVN pacienty se selhaným/neselhaným štěpem ukázalo, že u skupiny pacientů se selhaným štěpem byl vyšší podíl pacientů s: vyšší hladinou sérového kreatininu v době diagnózy BKVN, vyšší BK viremií v době diagnóz, dárci ženského pohlaví.

11 LITERATURA

Abend, J. R., Jiang, M., & Imperiale, M. J. (2009). BK virus and human cancer: Innocent until proven guilty. *Seminars in Cancer Biology*. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.02.004

Abend, J. R., Low, J. A., & Imperiale, M. J. (2010). Global effects of BKV infection on gene expression in human primary kidney epithelial cells. *Virology*, *397*(1), 73–79. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.047

Ambalathingal, G. R., Francis, R. S., Smyth, M. J., Smith, C., & Khanna, R. (2017). BK polyomavirus: Clinical aspects, immune regulation, and emerging therapies. *Clinical Microbiology Reviews*. https://doi.org/10.1128/CMR.00074-16

Awadalla, Y., Randhawa, P., Ruppert, K., Zeevi, A., & Duquesnoy, R. J. (2004). HLA mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00563.x

Babel, N., Fendt, J., Karaivanov, S., Bold, G., Arnold, S., Sefrin, A., … Reinke, P. (2009). Sustained BK viruria as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation*, *88*(1), 89–95. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181aa8f62

Babel, N., Volk, H.-D., & Reinke, P. (2011). BK polyomavirus infection and nephropathy: the virus-immune system interplay. *Nature Reviews. Nephrology*, *7*(7), 399–406. https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.59

Beimler, J., Sommerer, C., & Zeier, M. (2007). The influence of immunosuppression on the development of BK virus nephropathy-Does it matter? In *Nephrology Dialysis Transplantation* (Vol. 22). https://doi.org/10.1093/ndt/gfm646

Blyth, E., Clancy, L., Simms, R., Gaundar, S., O'Connell, P., Micklethwaite, K., & Gottlieb, D. J. (2011). BK virus-specific T cells for use in cellular therapy show specificity to multiple antigens and polyfunctional cytokine responses. *Transplantation*. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31823328c0

Bohl, D. L., & Brennan, D. C. (2007). BK virus nephropathy and kidney transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *2*(SUPPL. 1). https://doi.org/10.2215/CJN.00920207

Bohl, D. L., Brennan, D. C., Ryschkewitsch, C., Gaudreault-Keener, M., Major, E. O., & Storch, G. A. (2008). BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *Journal of Clinical Virology*, *43*(2), 184–189. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.06.009

Bohl, D. L., Storch, G. A., Ryschkewitsch, C., Gaudreault-Keener, M., Schnitzler, M. A., Major, E. O., & Brennan, D. C. (2005). Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01000.x

Brennan, D. C., Agha, I., Bohl, D. L., Schnitzler, M. A., Hardinger, K. L., Lockwood, M., … Storch, G. A. (2005). Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *American Journal of Transplantation*, *5*(3),

582–594. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00742.x

Burgelová, M. (2011). Imunosupresivní léčba po transplantaci ledviny – současné přístupy. *Remedia*, *4*.

Burgos, D., Jironda, C., Martín, M., González-Molina, M., & Hernández, D. (2010). Nefropatía asociada a infección por poliomavirus BK. *Nefrologia*. https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2010.Oct.10587

C., L., S., C., H., T., S., B., Y., Q., J.M., C., … H., G. (2019). Efficacy and safety of everolimus [EVR] with reduced-dose calcineurin inhibitor [rCNI] in de novo kidney transplant recipients [KTxRs]: M24 results from the transform study. *Transplant International*. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/tri.13379

Chapman, J. R. (2010). The KDIGO clinical practice guidelines for the care of kidney transplant recipients. *Transplantation*. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181d62f1b

Comoli, P., Binggeli, S., Ginevri, F., & Hirsch, H. H. (2006). Polyomavirus-associated nephropathy: Update on BK virus-specific immunity. *Transplant Infectious Disease*. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2006.00167.x

Comoli, Patrizia, Azzi, A., Maccario, R., Basso, S., Botti, G., Basile, G., … Ginevri, F. (2004). Polyomavirus BK-specific immunity after kidney transplantation. *Transplantation*, *78*(8), 1229–1232. https://doi.org/10.1097/01.TP.0000137932.44791.D3

Comoli, Patrizia, Cioni, M., Basso, S., Gagliardone, C., Potenza, L., Verrina, E., … Ginevri, F. (2013). Immunity to polyomavirus BK infection: Immune monitoring to regulate the balance between risk of BKV nephropathy and induction of alloimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*, *2013*. https://doi.org/10.1155/2013/256923

Costa, C., Bergallo, M., Sidoti, F., Astegiano, S., Terlizzi, M. E., Mazzucco, G., … Cavallo, R. (2009). Polyomaviruses BK- And JC-DNA quantitation in kidney allograft biopsies. *Journal of Clinical Virology*, *44*(1), 20–23. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.08.006

Cubitt, C. L. (2006). Molecular genetics of the BK virus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/0-387-32957-9_6

Dadhania, D., Snopkowski, C., Ding, R., Muthukumar, T., Chang, C., Aull, M., … Suthanthiran, M. (2008). Epidemiology of BK virus in renal allograft recipients: independent risk factors for BK virus replication. *Transplantation*, *86*(4), 521–528. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31817c6447

Dall, A., & Hariharan, S. (2008). BK virus nephritis after renal transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *3*(SUPPL. 2). https://doi.org/10.2215/CJN.02770707

Daniels, R., Sadowicz, D., & Hebert, D. N. (2007). A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathogens*. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030098

De Gascun, C. F., & Carr, M. J. (2013). Human polyomavirus reactivation: Disease pathogenesis and treatment approaches. *Clinical and Developmental Immunology*. https://doi.org/10.1155/2013/373579

Decaprio, J. A., & Garcea, R. L. (2013). A cornucopia of human polyomaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. https://doi.org/10.1038/nrmicro2992

Dharnidharka, V. R., Cherikh, W. S., Neff, R., Cheng, Y., & Abbott, K. C. (2010). Retransplantation after BK virus nephropathy in prior kidney transplant: An OPTN database analysis: Brief communication. *American Journal of Transplantation*.

https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03083.x

Ding, R., Medeiros, M., Dadhania, D., Muthukumar, T., Kracker, D., Kong, J. M., … Suthanthiran, M. (2002). Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation*. https://doi.org/10.1097/00007890-200210150-00016

Drachenberg, C. B., & Papadimitriou, J. C. (2006). Polyomavirus-associated nephropathy: Update in diagnosis. *Transplant Infectious Disease*. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2006.00154.x

Drachenberg, C B, Hirsch, H. H., Ramos, E., & Papadimitriou, J. C. (2005). Polyomavirus disease in renal transplantation: review of pathological findings and diagnostic methods. *Hum Pathol*, *36*(12), 1245–1255. https://doi.org/S0046-8177(05)00449-1 [pii]\r10.1016/j.humpath.2005.08.009

Drachenberg, Cinthia B., Hirsch, H. H., Papadimitriou, J. C., Gosert, R., Wali, R. K., Munivenkatappa, R., … Ramos, E. (2007). Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: A prospective evaluation. *Transplantation*. https://doi.org/10.1097/01.tp.0000269706.59977.a5

Drachenberg, Cinthia B., Papadimitriou, J. C., Hirsch, H. H., Wali, R., Crowder, C., Nogueira, J., … Ramos, E. (2004). Histological patterns of polyomavirus nephropathy: Correlation with graft outcome and viral load. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1046/j.1600-6143.2004.00603.x

Dugan, a S., Eash, S., & Atwood, W. J. (2006). Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transplant Infectious Disease : An Official Journal of the Transplantation Society*, *8*(2), 62–67. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2006.00153.x

Eash, S., & Atwood, W. J. (2005). Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *Journal of Virology*, *79*(18), 11734–11741. https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11734-11741.2005

Egli, A., Infanti, L., Dumoulin, A., Buser, A., Samaridis, J., Stebler, C., … Hirsch, H. H. (2009). Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *The Journal of Infectious Diseases*, *199*(6), 837–846. https://doi.org/10.1086/597126

Elfadawy, N., Flechner, S. M., Schold, J. D., Srinivas, T. R., Poggio, E., Fatica, R., … Mossad, S. B. (2014). Transient versus persistent BK viremia and long-term outcomes after kidney and kidney-pancreas transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. https://doi.org/10.2215/CJN.08420813

Ethem, U., Ahmet, T., Muhammed Taha, D., & Omer Faruk, O. (2018). Viral Infections after Kidney Transplantation: An Updated Review. *International Journal of Virology and AIDS*. https://doi.org/10.23937/2469-567x/1510040

Feltkamp, M. C. W., Kazem, S., van der Meijden, E., Lauber, C., & Gorbalenya, A. E. (2013). From Stockholm to Malawi: Recent developments in studying human polyomaviruses. *Journal of General Virology*. https://doi.org/10.1099/vir.0.048462-0

Fishman, J. A. (2009). Introduction: Infection in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02887.x

Fogazzi, G. B., Cantú, M., & Saglimbeni, L. (2001). “Decoy cells” in the urine due to polyomavirus BK infection: Easily seen by phase-contrast microscopy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. https://doi.org/10.1093/ndt/16.7.1496

Gardner, S., Field, A., Coleman, D., & Hulme, B. (1971). New human papova (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *The Lancet*, *297*(7712), 1253–1257. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91776-4

Geddes, C. C., Gunson, R., Mazonakis, E., Wan, R., Thomson, L., Clancy, M., & Carman, W. F. (2011). BK viremia surveillance after kidney transplant: Single-center experience during a change from cyclosporine-to lower-dose tacrolimus-based primary immunosuppression regimen. *Transplant Infectious Disease*. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2010.00566.x

Ginevri, F., Azzi, A., Hirsch, H. H., Basso, S., Fontana, I., Cioni, M., … Comoli, P. (2007). Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01984.x

Grellier, J., Hirsch, H. H., Mengelle, C., Esposito, L., Hebral, A. L., Bellière, J., … Kamar, N. (2018). Impact of donor BK polyomavirus replication on recipient infections in living donor transplantation. *Transplant Infectious Disease*. https://doi.org/10.1111/tid.12917

Halloran, P. F. (2004). Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *The New England Journal of Medicine*, *351*, 2715–2729. https://doi.org/10.1056/NEJMra033540

Hassan, S., Mittal, C., Amer, S., Khalid, F., Patel, A., Delbusto, R., … Ramesh, M. (2014). Currently recommended BK virus (BKV) plasma viral load cutoff of ≥4 log10/mL underestimates the diagnosis of BKV-associated nephropathy: A single transplant center experience. *Transplant Infectious Disease*. https://doi.org/10.1111/tid.12164

Helle, F., Brochot, E., Handala, L., Martin, E., Castelain, S., Francois, C., & Duverlie, G. (2017). Biology of the BKPyV: An update. *Viruses*. https://doi.org/10.3390/v9110327

Henriksen, S., Hansen, T., Bruun, J.-A., & Rinaldo, C. H. (2016). The Presumed Polyomavirus Viroporin VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release. *Journal of Virology*. https://doi.org/10.1128/JVI.01326-16

Herman, J., Van Ranst, M., Snoeck, R., Beuselinck, K., Lerut, E., & Van Damme-Lombaerts, R. (2004). Polyomavirus infection in pediatric renal transplant recipients: evaluation using a quantitative real-time PCR technique. *Pediatr Transplant*, *8*(5), 485–492. https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2004.00211.x\rPTR211 [pii]

Hirsch, H. H., & Randhawa, P. (2013). BK polyomavirus in solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/ajt.12110

Hirsch, H H, Randhawa, P., & Hirsch, H. H. (2013). BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation the AST Infectious Diseases Community of Practice. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/ajt.12110

Hirsch, Hans H. (2005). BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *41*(3), 354–360. https://doi.org/10.1086/431488

Hirsch, Hans H, Brennan, D. C., Drachenberg, C. B., Ginevri, F., Gordon, J., Limaye, A. P., … Trofe, J. (2005). Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*, *79*(10), 1277–1286. https://doi.org/10.1097/01.TP.0000156165.83160.09

Hirsch, Hans H, Knowles, W., Dickenmann, M., Passweg, J., Klimkait, T., Mihatsch, M. J., & Steiger, J. (2002). Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *The New England Journal of Medicine*,

347(7), 488–496. https://doi.org/10.1056/NEJMoa020439

Hoffmann, S. C., Hale, D. A., Kleiner, D. E., Mannon, R. B., Kampen, R. L., Jacobson, L. M., … Kirk, A. D. (2005). Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *American Journal of Transplantation*, *5*(3), 573–581. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00719.x

Hsiao, C.-Y., Pilmore, H. L., Zhou, L., & de Zoysa, J. R. (2016). Outcomes of renal transplant recipients with BK virus infection and BK virus surveillance in the Auckland region from 2006 to 2012. *World Journal of Nephrology*. https://doi.org/10.5527/wjn.v5.i6.497

Hurdiss, D. L., Morgan, E. L., Thompson, R. F., Prescott, E. L., Panou, M. M., Macdonald, A., & Ranson, N. A. (2016). New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure*. https://doi.org/10.1016/j.str.2016.02.008

Kadambi, P. V., Josephson, M. A., Williams, J., Corey, L., Jerome, K. R., Meehan, S. M., & Limaye, A. P. (2003). Treatment of refractory BK virus-associated nephropathy with cidofovir. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2003.30202.x

Karuthu, S., & Blumberg, E. A. (2012). Common infections in kidney transplant recipients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. https://doi.org/10.2215/CJN.04410512

Khamash, H. A., Wadei, H. M., Mahale, A. S., Larson, T. S., Stegall, M. D., Cosio, F. G., & Griffin, M. D. (2007). Polyomavirus-associated nephropathy risk in kidney transplants: The influence of recipient age and donor gender. *Kidney International*. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002247

Knowles, W. A. (2006). Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/0-387-32957-9_2

Koukoulaki, M., Grispou, E., Pistolas, D., Balaska, K., Apostolou, T., Anagnostopoulou, M., … Drakopoulos, S. (2009). Prospective monitoring of BK virus replication in renal transplant recipients. *Transplant Infectious Disease : An Official Journal of the Transplantation Society*, *11*(1), 1–10. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2008.00342.x

Krejci, K., Tichy, T., Bednarikova, J., Zamboch, K., & Zadrazil, J. (2018). BK virus-induced renal allograft nephropathy. *Biomedical Papers*. https://doi.org/10.5507/bp.2018.018

Kuypers, D. R. J. (2012). Management of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *Nature Reviews Nephrology*, *8*(7), 390–402. https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.64

Lamarche, C., Orio, J., Collette, S., Senécal, L., Hébert, M.-J., Renoult, É., … Delisle, J.-S. (2016). BK Polyomavirus and the Transplanted Kidney: Immunopathology and Therapeutic Approaches. *Transplantation*, *100*(11), 2276–2287. https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001333

Lee, B. T., Gabardi, S., Grafals, M., Hofmann, R. M., Akalin, E., Aljanabi, A., … Chandraker, A. (2014). Efficacy of levofloxacin in the treatment of BK viremia: A multicenter, double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. https://doi.org/10.2215/CJN.04230413

Li, X., Sun, Q., Chen, J., Ji, S., Wen, J., Cheng, D., & Liu, Z. (2013). Immunophenotyping in BK

virus allograft nephropathy distinct from acute rejection. *Clinical and Developmental Immunology*. https://doi.org/10.1155/2013/412902

Mannon, R. B., Hoffmann, S. C., Kampen, R. L., Cheng, O. C., Kleiner, D. E., Ryschkewitsch, C., … Kirk, A. D. (2005). Molecular evaluation of BK polyomavirus nephropathy. *American Journal of Transplantation*, *5*(12), 2883–2893. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01096.x

Mannon, Roslyn B., & Kirk, A. D. (2006). Beyond histology: novel tools to diagnose allograft dysfunction. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. https://doi.org/10.2215/CJN.01681105

Masutani, K., Ninomiya, T., & Randhawa, P. (2013). HLA-A2, HLA-B44 and HLA-DR15 are associated with lower risk of BK viremia. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *28*(12), 3119–3126. https://doi.org/10.1093/ndt/gft298

Moens, U., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., Ramqvist, T., Feltkamp, M. C. W., Daugherty, M. D., … Ehlers, B. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Polyomaviridae. *Journal of General Virology*. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000839

Moriyama, T., Marquez, J. P., Wakatsuki, T., & Sorokin, A. (2007). Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of Virology*, *81*(16), 8552–8562. https://doi.org/10.1128/JVI.00924-07

Moriyama, T., & Sorokin, A. (2009). BK virus (BKV): Infection, propagation, quantitation, purification, labeling, and analysis of cell entry. *Current Protocols in Cell Biology*. https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2602s42

Mueller, K., Schachtner, T., Sattler, A., Meier, S., Friedrich, P., Trydzenskaya, H., … Babel, N. (2011). BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. *Transplantation*, *91*(1), 100–107. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181fe1335

Nesselhauf, N., Strutt, J., & Bastani, B. (2015). Evaluation of leflunomide for the treatment of BK viremia and biopsy proven BK nephropathy; a single center experience. *Journal of Nephropathology*. https://doi.org/10.15171/jnp.2016.06

Nickeleit, V., & Mihatsch, M. J. (2006). Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: An update on an escalating threat. *Transplant International*. https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2006.00360.x

Novotná, E., & Viklický, O. (2008). BK viral infection after renal transplantation. *Vnitrni Lekarstvi*.

Pai, D., Mann, D. M., Malik, A., Hoover, D. R., Fyfe, B., & Mann, R. A. (2015). Risk Factors for the Development of BK Virus Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*. https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.08.006

Park, S. B., Kwak, J. H., Lee, K. T., Hwang, E. A., Han, S. Y., Kim, H. T., … Kim, H. C. (2006). Polyoma Virus-Associated Nephropathy and Concurrent Cytomegalovirus Infection in the Kidney Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*, *38*(7), 2059–2061. https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.06.107

Park, W. Y., Kang, S. S., Jin, K., Park, S. B., Choe, M., & Han, S. (2018). Long-term prognosis of BK virus-associated nephropathy in kidney transplant recipients. *Kidney Research and Clinical Practice*. https://doi.org/10.23876/j.krcp.2018.37.2.167

Pello, O. M., Innes, A. J., Bradshaw, A., Finn, S. A., Uddin, S., Bray, E., … Pavlů, J. (2017). BKV-specific T cells in the treatment of severe refractory haemorrhagic cystitis after HLA-

haploidentical haematopoietic cell transplantation. *European Journal of Haematology*. https://doi.org/10.1111/ejh.12848

Randhawa, P., & Brennan, D. C. (2006). BK virus infection in transplant recipients: An overview and update. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01403.x

Randhawa, P., Pastrana, D. V., Zeng, G., Huang, Y., Shapiro, R., Sood, P., … Buck, C. B. (2015). Commercially available immunoglobulins contain virus neutralizing antibodies against all major genotypes of polyomavirus BK. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/ajt.13083

Reisman, L., Habib, S., McClure, G. B., Latiolais, L. S., & Vanchiere, J. A. (2014). Treatment of BK virus-associated nephropathy with CMX001 after kidney transplantation in a young child. *Pediatric Transplantation*. https://doi.org/10.1111/petr.12340

Roufosse, C., Simmonds, N., Clahsen-Van Groningen, M., Haas, M., Henriksen, K. J., Horsfield, C., … Becker, J. U. (2018). A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002366

S., S., H.H., H., M., D., J., S., M.J., M., H., H., & M., M. (2010). Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *American Journal of Transplantation*. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03310.x

Sawinski, D., & Goral, S. (2014). BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, (February 2014), 1–9. https://doi.org/10.1093/ndt/gfu023

Schachtner, T., Mü ller, K., Stein, M., Diezemann, C., Sefrin, A., Babel, N., & Reinke, P. (2011). BK virus-specific immunity kinetics: A predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy. *American Journal of Transplantation*, *11*(11), 2443–2452. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03693.x

Schachtner, Thomas, Stein, M., & Reinke, P. (2015). ABO desensitization affects cellular immunity and infection control after renal transplantation. *Transplant International*. https://doi.org/10.1111/tri.12616

Schmidt, T., Adam, C., Hirsch, H. H., Janssen, M. W. W., Wolf, M., Dirks, J., … Sester, U. (2014). BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. *American Journal of Transplantation*, *14*(6), 1334–1345. https://doi.org/10.1111/ajt.12689

Sharif, A., Alachkar, N., Bagnasco, S., Geetha, D., Gupta, G., Womer, K., … Kraus, E. (2012). Incidence and outcomes of BK virus allograft nephropathy among ABO- and HLA-incompatible kidney transplant recipients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. https://doi.org/10.2215/CJN.00770112

Singh, H. K., Andreoni, K. A., Madden, V., True, K., Detwiler, R., Weck, K., & Nickeleit, V. (2009). Presence of Urinary Haufen Accurately Predicts Polyomavirus Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. https://doi.org/10.1681/ASN.2008010117

Singh, Harsharan K., Reisner, H., Derebail, V. K., Kozlowski, T., & Nickeleit, V. (2015). Polyomavirus nephropathy: Quantitative urinary polyomavirus-haufen testing accurately predicts the degree of intrarenal viral disease. *Transplantation*.

https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000367

Song, T. R., Rao, Z. S., Qiu, Y., Liu, J. P., Huang, Z. L., Wang, X. D., & Lin, T. (2016). Fluoroquinolone prophylaxis in preventing BK polyomavirus infection after renal transplant: A systematic review and meta-analysis. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. https://doi.org/10.1016/j.kjms.2016.01.004

Sood, P., Senanayake, S., Sujeet, K., Medipalli, R., Zhu, Y. R., Johnson, C. P., & Hariharan, S. (2012). Management and outcome of BK viremia in renal transplant recipients: A prospective single-center study. *Transplantation*. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31826690c6

Tong, A., Budde, K., Gill, J., Josephson, M. A., Marson, L., Pruett, T. L., … Chapman, J. R. (2016). Standardized Outcomes in Nephrology-Transplantation: A Global Initiative to Develop a Core Outcome Set for Trials in Kidney Transplantation. *Transplantation Direct*, *2*(6), e79. https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000593

Trydzenskaya, H., Juerchott, K., Lachmann, N., Kotsch, K., Kunert, K., Weist, B., … Babel, N. (2013). The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients. *Kidney International*, *84*(2), 359–365. https://doi.org/10.1038/ki.2013.59

van Doesum, W. B., Gard, L., Bemelman, F. J., de Fijter, J. W., Homan van der Heide, J. J., Niesters, H. G., … Sanders, J. S. F. (2017). Incidence and outcome of BK polyomavirus infection in a multicenter randomized controlled trial with renal transplant patients receiving cyclosporine-, mycophenolate sodium-, or everolimus-based low-dose immunosuppressive therapy. *Transplant Infectious Disease*. https://doi.org/10.1111/tid.12687

Vasudev, B., Hariharan, S., Hussain, S. A., Zhu, Y.-R., Bresnahan, B. A., & Cohen, E. P. (2005). BK virus nephritis: Risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney International*, *68*, 1834–1839. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00602.x

Viklický, O. (2010). Imunosuprese po transplantaci ledviny. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, *24*(2).

Viklický, O., Janoušek, L., & Baláž, P. (2008). *Transplantace ledviny v klinické praxi*. Praha: Grada.

Vu, D., Shah, T., Ansari, J., Naraghi, R., & Min, D. (2015). Efficacy of intravenous immunoglobulin in the treatment of persistent BK viremia and BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Transplantation Proceedings*. https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.01.012

Womer, K. L., Huang, Y., Herren, H., Dibadj, K., Peng, R., Murawski, M., … Kaplan, B. (2010). Dendritic cell deficiency associated with development of BK viremia and nephropathy in renal transplant recipients. *Transplantation*. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181bc6096

12 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

a) s IF:

GIRMANOVÁ, E., BRABCOVÁ, I., KLÉMA, J., HŘIBOVÁ, P., WOHLFAHRTOVÁ, M., SKIBOVÁ, J., VIKLICKÝ, O. Molecular network involved in the immune control of BK polyomavirus. Clinical&Developmental Immunology. 2012, ID 972102-9. ISSN 1740-2522. **IF 3,064**

GIRMANOVÁ, E., BRABCOVÁ, I., BANDÚR, Š., HŘIBOVÁ, P., SKIBOVÁ, J., VIKLICKÝ, O. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 120 Czech renal transplant recipients. Journal of medical virology. 2011, 83(8):1395-1400. ISSN 0146-6615. **IF 2,820**

b) bez IF:

NOVOTNÁ, E., VIKLICKÝ, O. BK virová infekce po transplantaci ledvin. *Vnitřní lékařství.* 2008, 54(9):835-841. ISSN 0042-773X.

Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace

a) s IF:

GIRMANOVÁ, E., HRUBÁ, P., VIKLICKÝ, O. Circulating biomarkers of tolerance. Transplantation Reviews. 2015, 29(2):68-72.ISSN 0955-470X. **IF 2,660**

STRAŇAVOVÁ, L., HRUBÁ, P., **GIRMANOVÁ, E.,** TÝCOVÁ, I., SLAVČEV, A., FRONĚK, J., SLATINSKÁ, J., REINKE, P.,VOLK, HD., VIKLICKÝ,O. The effect of induction therapy on established CMV specific T cell immunity in living donor kidney transplantation. Physiological research.2018, 67(2):251-260. ISSN 0862-8408. **IF 1,324**

TÝCOVÁ, I., HRUBÁ, P., MAIXNEROVÁ, D., **GIRMANOVÁ, E**., MRÁZOVÁ, P, STRAŇAVOVÁ, L., ZACHOVAL, R., MERTA, M., SLATINSKÁ, J., KOLLÁR, M., HONSOVÁ, E., TESAŘ, V., VIKLICKÝ, O. Molecular profilig in IgA nephropathy and focal and segmental glomerulosclerosis. *Physiological Research.* 2018, 67(1):93-105.ISSN 0862-8408. **IF 1,324**

HRUBÁ, P., TÝCOVÁ, I., KREPSOVÁ, E., **GIRMANOVÁ, E**., SEKERKOVÁ, A., SLATINSKÁ, J., STRÍŽ, I., HONSOVÁ, E., BRABCOVÁ, I., BANDÚR, Š., HŘIBOVÁ, P., SKIBOVÁ, J., VIKLICKÝ, O. Steroid

free immunosuppression is associated with enhanced Th1 transcripts in kidney transplantation. Transplant Immunology. 2017, 42:18-23. ISSN 0966-3274 **IF 1,317**

TÝCOVÁ, I., SULKOVÁ, SD., ŠTĚPÁNKOVÁ, J., KREJČÍK, Z., MERKEROVÁ, MD., STRÁNECKÝ, V., HRUBÁ, P., **GIRMANOVÁ, E.,** ČERNOCH, M., LIPÁR, K., MARADA, T., POVÝŠIL, C., VIKLICKÝ, O. Molecular patterns of diffuse and nodular parathyroid hyperplasia in long-term hemodialysis. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2016, 311(4): E720-E729.ISSN 0193-1849. **IF 3,825**

KRYŠTŮFKOVÁ, E., SEKERKOVÁ, A., STŘÍŽ, I., BRABCOVÁ, I., **GIRMANOVÁ, E**., VIKLICKÝ, O. Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy. Nephrology Dialysis Transplantation. 2012, 27(6):2576-2582. ISSN 0931-0509.

IF 3,371

URBANOVÁ, M., BRABCOVÁ, I., **GIRMANOVÁ, E.,** ZELEZNY, F., VIKLICKÝ, O. Differential regulation of the nuclear factor-kB pathway by rabbit antithymocyte globulins in kidney transplantation. *Transplantation.* 2012, 93(6):589-596. ISSN 0041-1337. **IF 3,781**

BRABCOVÁ, I., TESAŘ, V., HONSOVÁ, E., LODERÉROVÁ, A., **NOVOTNÁ, E.,** MAIXNEROVÁ, D., MERTA, M., BÜRGELOVÁ, M., HŘIBOVÁ, P., SKIBOVÁ, J., ZADRAŽIL, J., MALÝ, J., VIKLICKÝ, O. Association of advanced vasculopathy and transforming growth factor-beta1 gene expression with immunoglobulin A nephropathy progression. Nephrology Dialysis Transplantation. 2011, 26(2), 573-579. ISSN 0931-0509. **IF 3,396**

BANDÚR, Š., PETRÁŠEK, J., HŘIBOVÁ, P., **NOVOTNÁ, E.,** BRABCOVÁ, I., VIKLICKÝ, O. Haplotypic arrangement in CYP3Al locus is associated with side effects of proliferative signal inhibitors in renal transplant recipients. Transplantation. 2011, 91(1): "e1"-"e2". ISSN 0041-1337 **IF 4,003**

BANDÚR, Š., PETRÁŠEK, J., HŘIBOVÁ, P., **NOVOTNÁ, E.,** BRABCOVÁ, I., VIKLICKÝ, O. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. Transplantation. 2008, 86(9): 1206-1213. ISSN 0041-1337.

IF 3,816

Celkem citací autorky: 120 **Celkem IF: 34,701**

13 PŘÍLOHY PUBLIKACÍ

Příloha 1. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 120 Czech renal transplant recipients.

Příloha 2. Molecular network involved in the immune control of BK polyomavirus.

Příloha 3. BK virová infekce po transplantaci ledvin.

Příloha 1.

A prospective longitudinal study of BK virus infection in 120 czech renal transplant recipients

Girmanová, E., Brabcová, I., Bandúr, Š., Hřibová, P., Skibová, J., Viklický, O.

Journal of medical virology. 2011, 83(8):1395-1400.

Příloha 2.

Molecular network involved in the immune control of BK polyomavirus

Girmanová, E., Brabcová, I., Kléma, J., Hřibová, P., Wohlfahrtová, M., Skibová, J., Viklický, O.

Clinical&Developmental Immunology. 2012, ID 972102-9.

Příloha 3.

BK virová infekce po transplantaci ledvin

Novotná, E., Viklický, O.

Vnitřní lékařství. 2008, 54(9):835-841.