

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**  
Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

**BK VIROVÁ INFEKCE U PACIENTŮ PO TRANSPLANTACI LEDVINY**

**Mgr. Eva Girmanová**

Praha, 2019

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D

Školící pracoviště: Transplantační laboratoř  
Kliniky nefrologie IKEM  
Václavské 1958/9, Praha 4

Autor: Mgr. Eva Girmanová

Školitel: Prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## OBSAH

OBSAH .....	3
1. SOUHRN .....	4
2. SOUHRN V AJ .....	5
3. ÚVOD .....	6
4. CÍLE PRÁCE .....	8
5. MONITOROVACÍ STUDIE .....	8
5.1 METODIKA .....	8
5.2 VÝSLEDKY .....	9
5.3 DISKUSE .....	11
6. STUDIE GENOVÉ EXPRESE .....	12
6.1 METODIKA .....	12
6.2 VÝSLEDKY .....	12
6.3 DISKUSE .....	14
7. OBSERVAČNÍ STUDIE .....	16
7.1 METODIKA .....	16
7.2 VÝSLEDKY .....	16
7.3 DISKUSE .....	19
8. ZÁVĚR .....	21
9. LITERATURA .....	22
10. PUBLIKAČNÍ ČINNOST .....	25

## 1. SOUHRN

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 3 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  $6,7 \times 10^7$  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 viremii 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 viremii  $>10^4$ , 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 viremii v době diagnózy, dárce ženského pohlaví.

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

## 2. SOUHRN V AJ

Polyoma BK virus is associated with graft dysfunction leading to BK viral nephropathy (BKVN) in 1-10 % of kidney transplant recipients. Moreover about 30 % 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  $6.7 \times 10^7$  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 asymptomatic viruria 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 je příčinou závažných komplikací, nejčastěji ve formě BK virové nefropatie, která vede ke ztrátě štěpu u 1-10 % transplantovaných.

#### **BK polyomavirus**

BK virus (BKV) patří do čeledi *Polyomaviridae*, náleží k rodu *Betapolyomavirus* (Moens et al., 2017). BKV je neobalený virus, T=7d ikozaedrálního tvaru, velikosti 40 až 44 nm. Genom BKV představuje cirkulární dvoušroubovicová molekula DNA obsahující 5300 párů bazí.

BKV nemá zvířecího hostitele, k přenosu dochází pouze z člověka na člověka (Moriyama & Sorokin, 2009). Přibližně u 80-90 % běžné populace je možno detekovat protilátky proti BKV. K primární infekci dochází v dětství. Předpokládá se, že primární infekce probíhá v mandlích, z nichž se pak virus šíří infikovanými monocyty do dalších orgánů. Virus se stává latentním a přežívá zejména v urinárním epitelu (Dall & Hariharan, 2008).

K reaktivaci a nízkému stupni replikace s bezpříznakovou virurií dochází u zhruba 5 % zdravé populace (Hans H Hirsch, 2005). U imunokompromitovaných pacientů po transplantaci ledvin nebo hematopoetických kmenových buněk může reaktivace BK viru způsobit vážné komplikace, včetně BK virové nefropatie, uretrální stenózy nebo hemoragické cystitidy (Ambalathingal, Francis, Smyth, Smith, & Khanna, 2017).

#### **BK virová infekce po transplantaci ledviny**

Pacienti po transplantaci ledviny dlouhodobě užívají imunosupresivní léčbu, která je prevencí odloučení transplantovaného štěpu. Imunosupresivní léčba je ale zatížena výskytem mnoha vedlejších účinků (infekce, kardiovaskulární komplikace, nefrotoxicita, malignity) (Halloran, 2004; Viklický, 2010). K nejintenzivnější imunosupresi dochází mezi 1. a 6. měsícem po transplantaci, kdy se také nejčastěji reaktivuje latentní BK virus (Viklický, 2010).

K reaktivaci viru dochází u 30-80 % pacientů po transplantaci ledviny (Ambalathingal et al., 2017; Brennan et al., 2005). Ke sledování BKV reaktivace byla dříve nejčastěji používána metodika sledování „decoy cells“ z moči pacienta, jejíž specificita byla však velmi nízká. Postupně byl v jednotlivých centrech zaveden screening založený na absolutní kvantifikaci virové DNA pomocí RT-qPCR. Tato metoda umožňuje stanovit absolutní počet kopií viru ve vzorku moči a séra (plazmy). Výsledky stanovení počtu kopií BK viru a vypočtené hraniční hodnoty pro rozvoj BKVN se výrazně liší mezi jednotlivými transplantačními centry (Ambalathingal et al., 2017).

#### **BK virová nefropatie**

U 1-10 % pacientů po transplantaci dochází k rozvoji BK virové nefropatie (BKVN) (Dall & Hariharan, 2008). Diagnóza BKVN je definitivně stanovena až z histologického potvrzení přítomnosti BKV inkluzí v tubulárních nebo glomerulárních buňkách epitelu v biopsii štěpu (C. B. Drachenberg & Papadimitriou, 2006). Typickým histologickým nálezem BKVN jsou tubulointersticiální změny s rozptýlenou zánětlivou infiltrací buněk, lýzou, atrofií a nekrózou tubulárního epitelu s expanzí a fibrózou intersticia.

Výsledek histologického vyšetření může být falešně negativní, a to zejména v časných stádiích BKVN. Důvodem je multifokální rozvoj infekce v ledvině, kdy při biopsii nedojde k zachycení poškozeného segmentu. Předchozí studie uváděly ztrátu štěpu u 47 % až 60 % BKVN během 5 let (Babel et al., 2009; Vasudev et al., 2005), zatímco současné studie využívající strategie včasného screeningu ukázaly sníženou ztrátu štěpu v rozmezí 15 % až 30 % BKVN (Babel et al., 2009).

### **Rizikové faktory BKV infekce a BKVN**

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem rozvoje BKV infekce (a následně BKVN) je míra imunosupresivní léčby. 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). 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 dárce 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).

### **Imunitní odpověď na BKV**

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).

### **Léčba BKV infekce a BKVN**

Doposud neexistují léky, které by konkrétně cílily proti BKV. Za základní terapeutický krok je u pacientů s BKVN považováno snížení imunosuprese (Hans H Hirsch et al., 2005), což ale vystavuje pacienta riziku vzniku akutní/chronické rejekce. Screening založený na polymerázové řetězové reakci pro replikaci BKV je základní strategií pro predikci časného nástupu BKVN a včasného preemptivního zásahu do léčby. V léčbě jsou dále zkoušeny i léky s dosud nepotvrzenou protivi BK virovou aktivitou (cidofovir, leflunomid, intravenózní lidský imunoglobulin). Vzhledem k tomu, že použití těchto léků je většinou kombinováno se snížením imunosuprese, je jejich účinnost těžko hodnotitelná (Kuypers, 2012).

## 4. CÍLE PRÁCE

1. Provést jednorochní monitoraci BK virové replikace u pacientů po transplantaci ledviny, stanovit hraniční hodnoty BK viremie a virurie pro rozvoj BKVN a zhodnotit rizikové faktory.
2. Vyhodnotit genovou expresi transkriptů spojených s imunitní odpovědí 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 v IKEM v letech 2009-2018.

## 5. 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 během prvního roku 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.

### 5.1 METODIKA

**Pacienti.** Do studie bylo zařazeno 120 konsekutivních pacientů, kteří od března 2007 do března 2008 v IKEM v Praze podstoupili transplantaci ledviny. Od pacientů byly odebrány vzorky periferní krve a moči, a to v časových intervalech: 1. den 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.

**Zpracování vzorků krve a izolace BKV DNA.** Krev byla odebrána do zkumavek VACUETTE® 5 ml sérum/gel a pomocí centrifugace 3000rpm/10 min získáno sérum. Moč i sérum byly skladovány při  $-20^{\circ}\text{C}$  až do doby dostatečného nashromáždění vzorků pro izolaci virové DNA.

**BKV-DNA kvantifikace v moči a séru.** Počet BKV kopií byl ve vzorcích stanoven pomocí metody absolutní kvantifikace real-time PCR. Použita byla souprava Alert BKV Q-PCR (Chemagen, DE) využívající detekci virového genu kódujícího velký T-antigen BKV a přístroje ABI Prism® 7900 H.T. System Sequence Detection (Applied Biosystems, CA, USA). PCR amplifikace byla připravována v reakčním objemu 25  $\mu\text{l}$ , který obsahoval 5  $\mu\text{l}$  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.

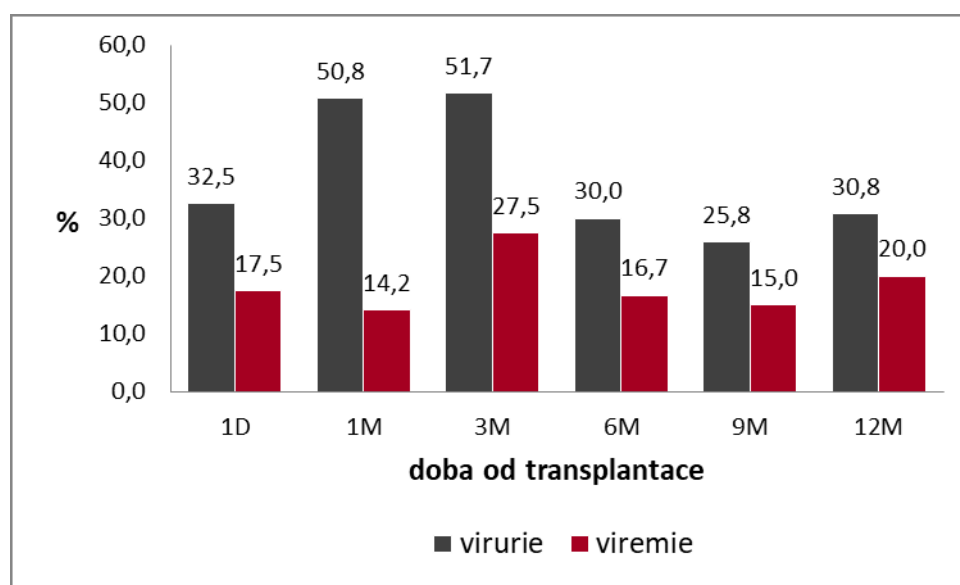
Standardní křivky pro absolutní kvantifikaci viru byly zkonstruovány vnesením Ct hodnot proti logaritmům ředící řady templátu v rozmezí od  $10^2$  do  $10^5$ . V případě, že rozdíl mezi duplikáty vzorků byl více než 0,5 Ct, bylo měření tohoto vzorku opakováno. Každý vzorek byl podroben současnému stanovení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



## 5.2 VÝSLEDKY

**BK virurie a viremie ve sledovaném souboru pacientů.** Celkem bylo analyzováno 1243 vzorků od 120 pacientů (622 z moči a 621 ze séra). Na Obrázku 1. je procentuální zastoupení pacientů s měřitelnou replikací BK viru (BK virurie  $>10^2$ , BK viremie  $>10^2$ ) v jednotlivých časových úsecích po transplantaci. 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.

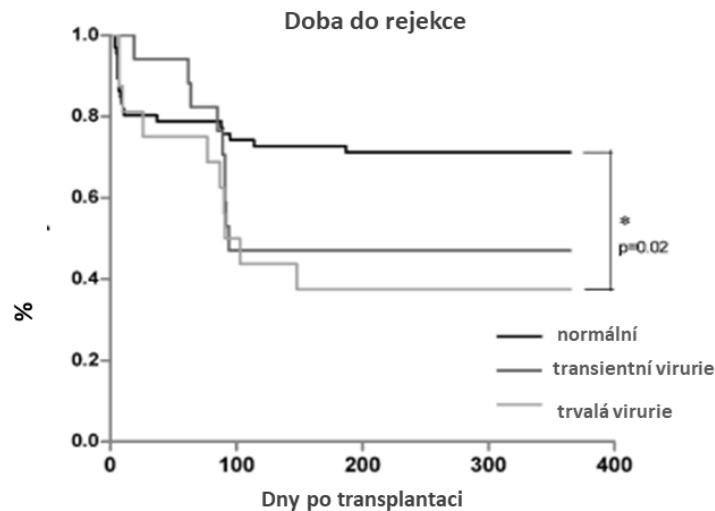


**Obrázek 1.** Na grafu jsou uvedeny počty pacientů s měřitelnou viremii  $>10^2$  a virurií  $>10^2$  během prvního roku po transplantaci.

**Pacienti s BK viremii  $>10^4$  kopií/ml séra.** Šest pacientů mělo BK viremii  $>10^4$  kopií/ml séra. U jednoho z těchto pacientů byla BKVN potvrzena biopticky, u tří pacientů se BK viremie ukázala jako přechodná. Ve srovnání s pacienty v kontrolní skupině byli pacienti s viremii  $>10^4$  před Tx ledviny déle dialyzováni ( $p < 0,05$ ).

**Pacienti s BK virurií  $>10^7$  kopií/ml moči.** 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 ( $p < 0,05$ ).

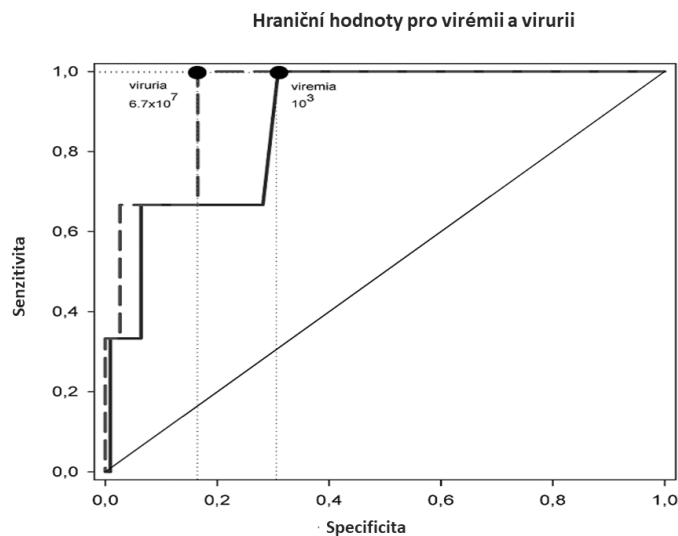
**BKV reaktivace trvalá versus přechodná a vztah k akutní rejeckci.** Ve skupině pacientů s trvalou virurií byl podíl pacientů, u kterých došlo během prvního roku po transplantaci ke vzniku akutní rejeckce významně vyšší, než u pacientů bez BKV reaktivace ( $p < 0,05$ ), (Obrázek 2.). Mezi skupinami nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v hodnotách PRA ani v ne/použití indukční léčby.



**Obrázek 2.** Kaplan-Meierova křivka času do rejekce

**Imunosuprese jako rizikový faktor pro replikaci BKV v moči.** Mezi pacienty s různými imunosupresivními protokoly nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl související s rozvojem BKVN či přítomností BK viru.

**Hraniční hodnoty BK viremie a virurie pro vznik BKVN ve sledovaném souboru.** K rozvoji BKVN došlo v naší sledované kohortě u tří pacientů. Pomocí ROC analýzy byly stanoveny hraniční hodnoty pro vznik BKVN na  $10^3$  kopií/ml séra pro BK viremie a  $6,7 \times 10^7$  kopií/ml (Obrázek 3.).



**Obrázek 3.** ROC křivka pro stanovení hraničních hodnot BK viremie a virurie pro vznik BKVN.

U studované populace pacientů po transplantaci ledviny vykazuje hodnota počtu kopií BK viru v séru vyšších než  $10^3$  kopií/ml senzitivitu 100 % a specifickou 69 % pro rozvoj BKVN. Hodnota BKV kopií vyšších než  $6,7 \times 10^7$  kopií /ml vykazuje senzitivitu 100 % a specifickou 83 % pro rozvoj BKVN.

### 5.3 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. Detekce viru v moči je velmi citlivá a byla v zahraničních studiích popsána u 30-80 % pacientů, detekce viru v séru pak v 8-50 % pacientů (Ambalathingal et al., 2017; Brennan et al., 2005; Cinthia B. Drachenberg et al., 2007). Alespoň v jednom odběru byl BK virus detekován v moči nebo v séru u 88 % pacientů. Na druhou stranu většina z pacientů, u kterých byla v našem souboru detekována viremie a/nebo virurie, nerozvinula BKVN a virus dokázala 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  $>10^4$  pak u 5 %, tento výskyt dobře koresponduje s výsledky zahraničních monitorovacích studií (Costa et al., 2009; Nickleit & 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 studii (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 viremii  $>10^4$  byla BKVN potvrzena histologicky.

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.

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 virurii ani u pacientů s BKVN.

## 6. 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.

### 6.1 METODIKA

**Pacienti.** Pro studium intrarenálních transkriptů byly použity vzorky biopsií ledvin. V první skupině byli **pacienti s bezpříznakovou BK virurií** (AV, n=9). Tito pacienti měli BK virurii vyšší než  $10^7$  kopií/ml ve třetím měsíci po Tx ledviny. Do konce prvního roku po Tx ledviny u všech došlo k vymizení BK viremie i virurie. Do druhé skupiny byli zařazeni pacienti s biopsicky potvrzenou **BK virovou nefropatií** (BKVN, n=10).

Do třetí, **kontrolní skupiny** (KS, n = 11), byli zařazeni pacienti, kteří měli v 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.

**Izolace RNA.** Celková RNA z části vzorku biopsie ledviny 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) a reverzní transkripcí přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí Superscript Reverse transcriptase II (Invitrogen).

**RT-qPCR pomocí TaqMan® Low Density Array (TLDA).** Relativní kvantifikace byla provedena na Taqman Low Density Array (TLDA, Applied Biosystems). Zhodnocení dat RT-qPCR bylo provedeno pomocí softwaru SDS 2.4 (Applied Biosystems) a relativní exprese genů 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.

### 6.2 VÝSLEDKY

**Intrarenální transkripční profil pacientů s bezpříznakovou BK virurií.** Exprese pěti genů vykazovala statisticky významný rozdíl mezi skupinou s bezpříznakovou virurií (AV) a kontrolní skupinou. 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- $\beta$ 1, byla u pacientů s asymptomatickou virurií významně snížena (Tabulka 1).

**Tabulka 1. Geny s rozdílnou aktivitou u pacientů s bezpříznakovou virurií**

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

#### ***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 2.

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 2. Geny s rozdílnou aktivitou u pacientů s BKVN**

geny	kontrolní skupina	BKVN	p
<b>C3</b>	0,06(0,02-0,6)	0,375(0,03-5,27)	0,022
<b>CCL2</b>	0,06 (0,01-0,12)	0,22 (0,03-0,85)	0,005
<b>CCL3</b>	0,12 (0-0,65)	0,71(0,16-5,89)	0,02
<b>CCL5</b>	3,26(0,41-45,4)	66,9(7,9-235)	0,003
<b>CCR2</b>	0(0-6,38)	20,7(0-158)	0,001
<b>CCR7</b>	0(0-659)	35,3(0-789)	0,017
<b>CD19</b>	0(0-104)	109(0-2440)	0,013
<b>CD28</b>	1,36(0-75,1)	59,3(0,74-448)	0,012
<b>CD4</b>	3,32(0,22-15,1)	27(6,63-209)	0,004
<b>CD68</b>	0,61(0,05-1,38)	1,68(0,97-4,79)	0,001
<b>CD86</b>	0,67(0,01-16,9)	10(0,88-32,3)	0,012
<b>CSF1</b>	1,42(0,02-4,89)	5,17(0,57-71,3)	0,049
<b>CXCL10</b>	0,05(0-2,9)	1,8(0,06-3,76)	0,015

<b>CXCR3</b>	0(0-34,3)	61,2(0-671)	0,013
<b>EDN1</b>	0,45(0,14-1,32)	1,18(0,39-8,74)	0,025
<b>FASL</b>	0(0-67,2)	145,72(25,96-409,25)	0,003
<b>GNLY</b>	0,36(0,12-2,1)	4,9(1,45-52,2)	0,001
<b>HLADRA</b>	0,39(0,15-3,27)	1,55(0,503-7,6)	0,021
<b>HLA-DRB1</b>	0(0-0,39)	0,85(0-85,6)	0,036
<b>ICAM1</b>	0,03(0-0,8)	0,235(0,06-13,1)	0,03
<b>IFNG</b>	2,65(0-139)	82,1(0-519)	0,023
<b>IL12B</b>	0(0-3,83)	3,49(0-37,6)	0,03
<b>IL1B</b>	0,17(0-0,95)	1,38(0,3-3,67)	0,002
<b>IL2RA</b>	0,14(0-3,44)	3,32(0,47-19)	0,009
<b>IL6</b>	0,05(0,01-3,49)	0,72(0,07-9,49)	0,048
<b>IL8</b>	0,55(0-6,75)	14,7(0,11-53,4)	0,004
<b>LTA</b>	0(0-93,9)	68,8(0-903)	0,036
<b>PRF1</b>	8,7(0-43,3)	117(1,4-4100)	0,007
<b>PTPRC</b>	1,52(0,55-24,6)	47,6(4,7-303)	0,001
<b>TBX21</b>	0(0-15,2)	7,14(0-383)	0,036
<b>TGFB</b>	0,73(0,23-6,75)	3,42(0,73-13)	0,025
<b>TNF</b>	0,61(0,04-3,18)	8,2(0,95-30,7)	0,002
<b>TNFRSF18</b>	0(0-1,77)	1,7(0-19,5)	0,01

Data jsou zobrazena jako medián (minimum-maximum).

### 6.3 DISKUSE

V této studii jsme se zaměřili na expresní profil u dvou skupin pacientů s různým stupněm BKV infekce, v porovnání s kontrolní skupinou bez BKV replikace. 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- $\gamma$ , 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 našli 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. U obou vyšetřovaných skupin lze zjistit aktivaci proliferace T lymfocytů, ale s odlišnou expresí genů pro interleukiny. Exprese IL4 byla typická pro bezpříznakové pacienty bez poškození štěpu, zatímco IL10 a IL6 byly exprimované ve vyšší míře u pacientů s BKV nefropatií. Tyto závěry však bude nutno ověřit v dalších experimentech.

## 7. 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 viremii 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 viremii/BKVN jsou horší než u štěpů u pacientů bez BK viremie/BKVN.

### 7.1 METODIKA

**Pacienti. 110 pacientů mělo** v některém z odběrů **BK 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 3.

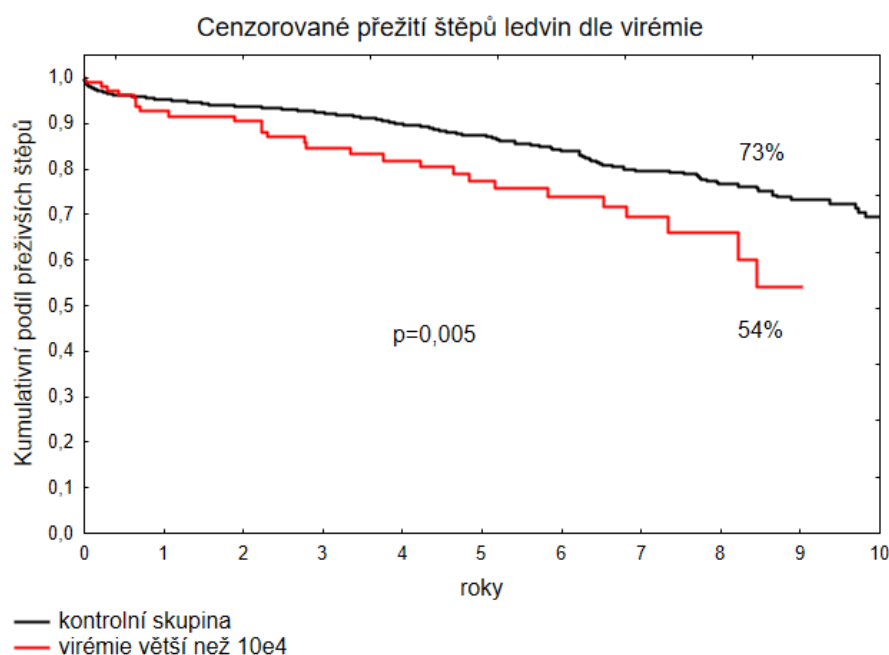
Jako kontrolní data byly použity údaje od všech pacientů, kteří podstoupili izolovanou transplantaci ledviny a byli léčeni na klinice nefrologie IKEM v letech 2008-2018 neměli dignostikovánu BKVN/viremii více než  $10^4$  kopií/ml plazmy (n=2058/n=2072) pacientů.

**Sledování BKV infekce.** V roce 2009 zavedla laboratoř lékařské genetiky IKEM stanovení počtu kopií BK viru. K vyšetření je použita plazma, a stanovení počtu kopií 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 čtvrtým měsícem po Tx ledviny a při zhoršení funkce štěpu s nejasnou příčinou.

### 7.2 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 viremii 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 viremii vyšší než  $10^4$  bylo významně horší (73% vs 54%, p=0,005) než u ostatních pacientů bez významné viremie (Obrázek 4.)





**Obrázek 4.** Cenzorované přežití štěpů ledvin u pacientů s viremíí  $>10^4$  v porovnání s kontrolní skupinou pacientů transplantovaných pacientů v letech 2008-2018.

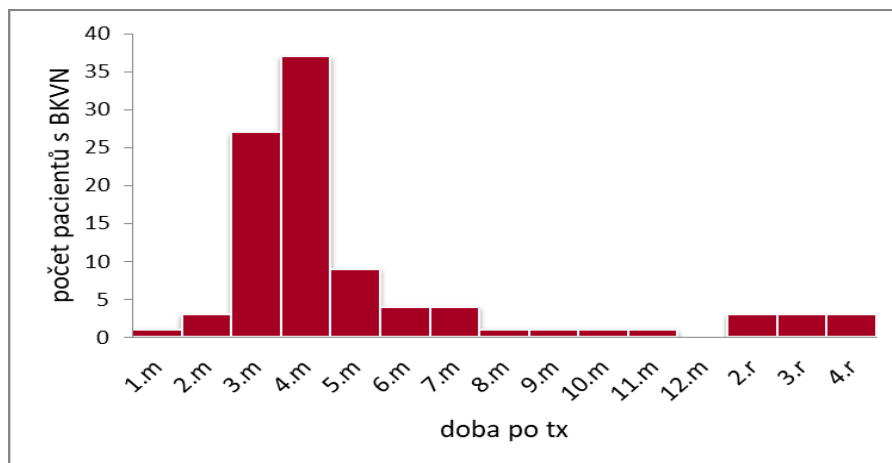
Porovnání demografických údajů (věk dárce, věk příjemce, doba na dialýze, doba studené ischemie, typ a pořadí transplantace) mezi pacienty bez/s BK virémie  $>10^4$  (kopii/ml) ukázalo, že mezi skupinami nebyl významný rozdíl v žádném ze sledovaných údajů ( $p>0,05$ ).

**Pacienti s BKVN.** Incidence BKVN podle roku transplantace je uvedena v Tabulce 3.

**Tabulka 3. 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

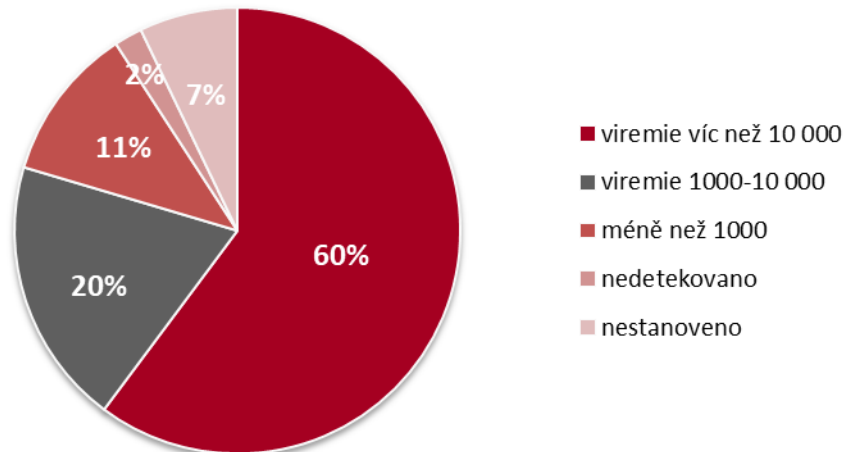
**BKVN v čase od transplantace.** Obrázek 5 znázorňuje počty pacientů s biopticky potvrzenou BKVN v čase od Tx. Medián diagnózy BKVN byl 101 dnů (10-1463) po Tx ledviny. Nejčastěji, o v 69 (72%) případech, byla BKVN diagnostikována v protokolární biopsii, která je v našem centru prováděna mezi 2. - 4. měsícem po Tx ledviny. Průměrný věk pacientů v době diagnózy byl  $53 \pm 14$ .



**Obrázek 5.** Počty pacientů s bioticky ověřenou BKVN v závislosti na čase od transplantace.

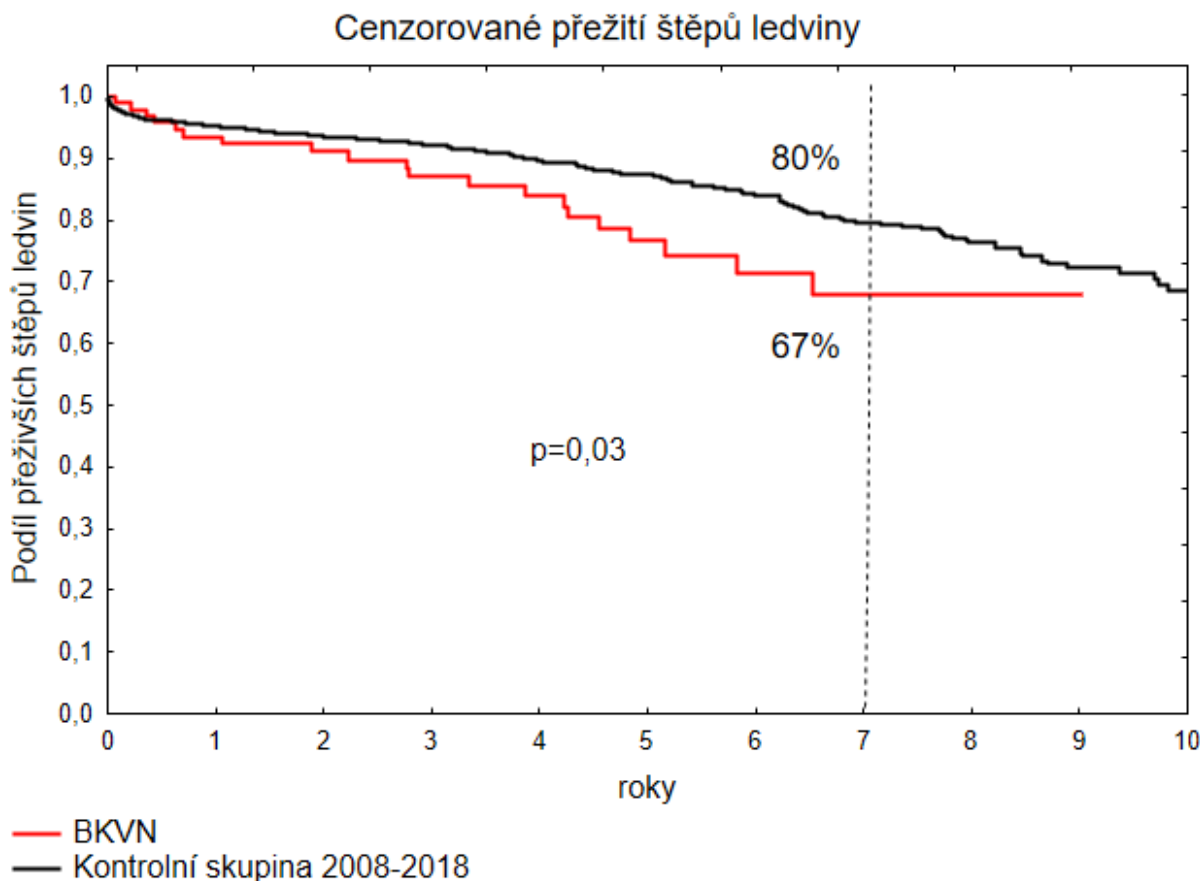
Porovnání demografických údajů (věk dárce, věk příjemce, doba na dialýze, doba studené ischemie, typ a pořadí transplantace) mezi pacienty s/bez BKVN ukázalo, že mezi skupinami nebyl významný rozdíl v žádném ze sledovaných údajů ( $p > 0,05$ ).

**Viremie v době diagnózy BKVN.** 58 (60 %) pacientů vykazovalo viremii více než  $10^4$  kopií/ml. U 18 pacientů (20 %) se naměřené hodnoty viremie pohybovaly mezi  $10^3$  a  $10^4$  kopií/ml. U 11 (11 %) pacientů byla naměřená viremie méně než  $10^3$  kopií/ml. U dvou pacientů nebyl virus detekován v době diagnózy. U 7 pacientů nebyla viremie v čase diagnózy BKVN vyšetřena.



**Obrázek 6.** Viremie v době diagnózy BKVN.

**Přežití štěpů s BKVN.** Štěpy od pacientů s BKVN ( $n=98$ ) měly výrazně horší přežití ( $p=0,03$ ) než štěpy bez BKVN ( $n=2072$ ) (Obrázek 7.). 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.



**Obrázek 7.** Cenzorované přežití štěpů ledvin u pacientů s BKVN oproti všem ostatním transplantovaným pacientům v letech 2008-2018.

**Rizikové faktory ztráty štěpu BKVN.** Jako významný prediktor selhání štěpu s diagnózou BKVN se ukázala hladina kreatininu v době diagnózy BKVN, virémie v době diagnózy, pohlaví dárce a maximální hladina PRA. Do multivariantační analýzy byly zahrnuty tři faktory (kreatinin v době diagnózy, BK virémie 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 5,9x a zvýšení kreatininu o jednotku 4,5x. 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.

**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 graftektomii). Oba pacienti jsou pravidelně sledováni na replikaci BK viru. Dalších 6 pacientů je úspěšně zařazeno na čekací listinu (všech 6 po graftektomii). U 3 pacientů došlo k úmrtí. Zbýlých 8 pacientů není zařazeno na čekací listinu, ani nepodstoupili retransplantaci.

### 7.3 DISKUSE

Vyšetření BK virémie 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. Ve třetí, observační studii jsme retrospektivně hodnotili dlouhodobé přežití štěpů ledviny u pacientů, kteří měli buď významnou virémii 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 viremíí/s BKVN oproti pacientům bez viremíe/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 viremíe  $10^4$  kopií/ml může podhodnocovat diagnózu nefropatie. Naše výsledky ukazují, že až 35 % pacientů může mít BKVN bez zjištěné významné viremíe, což koresponduje s výsledky z jiných center (Hassan et al., 2014). Stejně tak i samotné vyšetření s nálezem významné viremíe často nevede k histologickému potvrzení BKVN. V tomto ohledu se naše výsledky shodují s výsledky prof. Hirsche, který uvádí, že viremíe vyšší než  $10^4$  má pouze 30-50 % prediktivní hodnotu odhalení BK virové nefropatie histologickým vyšetřením (H H Hirsch, Randhawa, & Hirsch, 2013). Prognóza štěpu byla výrazně horší u pacientů, kteří měli v době diagnózy BKVN vyšší sérový kreatinin, vyšší hodnotu BK viremíe, měli dárce ženského pohlaví a maximální hodnotu PRA vyšší než pacienti v kontrolní skupině (Park et al., 2018).

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 jako jsou například fluorochinolony, cidofovir, léčba lidským imunoglobulinem či konverze na léky ze skupiny mTOR inhibitorů (Ambalathingal et al., 2017). Úspěch léčby je obvykle definován vymizením viremíe. V naší skupině jsme nenalezli rozdíl v použité léčbě mezi pacienty se selhaným a neselhaným štěpem.

## 8. 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 viremii 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;  $p < 0,05$ ), a funkční analýza ukázala významně zvýšenou přítomnost antiapoptotických a kostimulačních signálů.

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 BKV infekcí 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 viremii  $>10^4$ , 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 viremii v době diagnózy, dárci ženského pohlaví.

## 9. LITERATURA

- 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 viremia 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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, 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>
- 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>
- 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>
- 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  $\geq 4$  log<sub>10</sub>/mL underestimates the diagnosis of BKV-associated nephropathy: A single transplant center experience. *Transplant Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1111/tid.12164>
- 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> [pii]
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>

- 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., & 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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).



## 10. 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., BANDŮR, 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., BANDŮR, 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., LODEREROVÁ, 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**

BANDŮR, Š., PETRÁŠEK, J., HŘIBOVÁ, P., **NOVOTNÁ, E.**, BRABCOVÁ, I., VIKLICKÝ, O. Haplotypic arrangement in CYP3A1 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**

BANDŮR, 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 citace autorky: 120**

Celkem IF: 34,701