

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta



MUDr. Mariana Wohlfahrtová, PhD

Klinika nefrologie, Transplantcentrum IKEM, Praha
Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN, Praha

Akutní vaskulární rejekce transplantované ledviny

Habilitační práce

Praha 2019

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala za cenné rady, pomoc, bezbřehou podporu a vytvoření pracovních podmínek mému učiteli, profesorovi Ondřeji Viklickému, který mi umožnil poznat obor transplantační medicíny a je mi vzorem a inspirací v mém profesním životě. Děkuji mu za jeho cenné rady, ale i kritické připomínky, které mě nutí neustále na sobě pracovat a posouvat se dál.

Velké děkuji patří profesorovi F. G. Cosiovi z Department of Nephrology and Hypertension, Mayo Clinic ve Spojených Státech, který mě v průběhu mého studijního pobytu nadchnul pro vaskulární rejekci transplantované ledviny a naučil mě zabývat se pro klinika zdánlivě nedůležitými detaily v histologickém obrazu a nikdy se neuspokojit s nezodpovězenou otázkou.

Dále bych chtěla poděkovat svým spolupracovníkům z Transplantační laboratoře IKEM, a to zejména doktorce Petře Hrubé a doktorce Ireně Brabcové, za jejich pomoc a neutichající entuziasmus při zvládnutí metodické stránky projektů a analýze molekulárních dat.

Ráda bych poděkovala docentovi Jiřímu Klémovi a profesorovi Filipovi Železnému z Katedry kybernetiky Elektrotechnické fakulty ČVUT za jejich nesmírně cennou pomoc a trpělivost při biostatistické analýze a vizualizaci nadrozměrných dat.

Ráda bych poděkovala docentce Evě Honsové za pomoc při interpretaci renálních biopsií a doktorce Aleně Lodererové za spolupráci při imunohistochemickém vyšetření renální tkáně.

Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z Kliniky nefrologie TC IKEM za spolupráci, jmenovitě doktorce Kristýně Michalíčkové za její pomoc s editací prezentované práce.

Největší poděkování patří celé mé rodině, zejména však manželovi Petrovi a synovi Filipovi, bez jejich obrovské podpory a tolerance bych této mety nikdy nedosáhla.

Obsah

Seznam zkratk	6
1. Úvod	10
2. Fyziologie imunitního systému	12
2.1 Vrozená a získaná imunita	12
2.2 Antigeny HLA systému	12
2.3 Rozpoznání antigenů	13
2.3.1 Přímé rozpoznání antigenu	13
2.3.2 Nepřímé rozpoznání antigenu	13
2.3.3 Polopřímé rozpoznání antigenu	14
3. Rozdělení rejekce po transplantaci ledviny	15
4. Patofyziologie rejekce	16
4.1 Fáze senzibilizace	16
4.1.1 Imunitní rozpoznání antigenů dárce, aktivace T lymfocytů	16
4.1.2 Proliferace a diferenciací T lymfocytů	17
4.2 Efektorová fáze	18
4.2.1 Hyperakutní rejekce	18
4.2.2 Akutní rejekce	18
4.2.2.1 Akutní T buňkami zprostředkovaná rejekce	18
4.2.2.2 Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce	20
4.2.3 Chronická rejekce	21
5. Epidemiologie a rizikové faktory rejekce	22
6. Klinická manifestace rejekce	24
7. Diagnostika	25
7.1 Histologická klasifikace a sérologie	25
7.1.1 Akutní T buňkami zprostředkovaná rejekce	25
7.1.2 Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce	28
7.1.3 Limitace histologického vyšetření a vyšetření dárcovsky specifických protilátek	

v diagnostice akutní rejekce	30
7.2 Možnosti molekulární patologie	31
8. Terapeutické a preventivní možnosti u akutní rejekce	34
8.1 Léčba akutní T buňkami zprostředkované rejekce	34
8.2 Léčba akutní protilátkami zprostředkované rejekce	34
8.3 Preventivní strategie u akutní rejekce	35
9. Zhodnocení významu vlastních výsledků	37
10. Závěr	52
11. Literatura	53
12. Vybrané komentované publikace	60

Seznam zkratek

ABMR	akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce
AMRV	akutní protilátkami zprostředkovaná vaskulární rejekce
AP-1	aktivační protein 1
APC	antigen-prezentující buňka (z angl. antigen presenting cell)
ATG-F	antithymocytární globulin Fresenius®
AVR	akutní vaskulární rejekce
BCL11B	B lymfocytární chronická lymfatická leukémie/lymfom 11B (z angl. B-cell lymphoma/leukemia 11B)
BTLA	protein asociovaný s B a T lymfocyty (z angl. B and T lymphocyte associated protein)
CCL17	C-C Motif Chemokine Ligand 17
CCR7	C-C Motif Chemokine Receptor 7
CD2	CD2 molekula, povrchový antigen T lymfocytů
CDC	komplement – dependentní cytotoxicita
CDC CM	cytotoxická křížová zkouška
CI	intersticiální fibróza
CIV	skóre pro intersticiální fibrózu a fibrózní ztluštění intimy
CV	fibrózní ztluštění intimy
ClCr	clearance kreatininu
CM	křížová zkouška (tzv. crossmatch)
CNI	inhibitory kalcineurinů
CRP	C-reaktivní protein
CTLA4	protein 4 asociovaný s cytotoxickými T lymfocyty (B and T lymphocyte associated 4 protein)
CXCL13	C-X-C Motif Chemokine Ligand 13

DGF	opožděný rozvoj funkce (z angl. delayed graft function)
DHODH	dihydroorotátdehydrogenáza
DSA	dárcovsky specifické protilátky
ECD	dárce s rozšířenými kritérii (z angl. expanded criteria donor)
eGFR	odhadovaná glomerulární filtrace (z angl. estimated glomerular filtration rate)
ENDAT	genové transkripty asociované s endotelem (z angl. endothelial-associated transcripts)
FACS	průtoková cytometrie (z angl. fluorescence-activated cell sorting)
FXCM	křížová zkouška metodou průtokové cytometrie (z angl. flow cytometry cross-match)
g	glomerulitida
GIMAP5	GTPase IMAP Family Member 5
HC	hierarchická shluková analýza (z angl. hierarchical cluster analysis)
HLA	lidský hlavní histokompatibilní komplex (z angl. human leukocyte antigen)
i	intersticiální zánět
IL	interleukin
IL21R	receptor pro interleukin 21
IMPDH	inozinmonofosfátdehydrogenáza
IFN- γ	interferon gamma
IV	izolovaná v-léze
JAK	Janusova kináza
KLRG1	receptor G1 zabíječských buněk podobný lektinu G1 (z angl. Killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1)
LAX1	lymfocytární transmembránový adaptor (z angl. Lymphocyte transmembrane adaptor 1)
LCK	proteintyrozinkináza specifická pro lymfocyty (z angl. Lymphocyte Cell-Specific Protein-Tyrosine Kinase)

LTA	lymfotoxin alfa
LTB	lymfotoxin beta
MAP	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MFI	průměrná intenzita fluorescence (z angl. mean fluorescence intensity)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
MI	mikrovaskulární zánět
MICA	hlavní histokompatibilní komplex, třída 1, řetězec A (z angl. major-histocompatibility-complex class I-related chain A)
MMDx	diagnostický systém molekulárního mikroskopu (z angl. molecular microscope diagnostic system)
MMF	mykofenolát mofetil
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
mTOR	savčí receptor pro rapamycin (z angl. mammalian target of rapamycine)
NFAT	nukleární faktor aktivovaných T lymfocytů
NF-κB	nukleární faktor B
NK	přirozený zabiják (z angl. natural killer)
PI-3K	fosfoinositid- 3-kináza
PRA	panel reaktivní protilátky (z angl. panel reactive antibodies)
ptc	peritubulární kapilaritida
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
sAMRV	suspektní akutní protilátkami zprostředkovaná vaskulární rejekce
SLA2	adaptor 2 podobný Src (z angl. Src like adaptor 2)
SLAMF1	Signaling lymphocytic activation molecule family member 1
t	tubulitida
TCMR	T buňkami zprostředkovaná rejekce

TCMRV	T buňkami zprostředkovaná vaskulární rejekce
TCR	receptor T- lymfocytu
TGF- β	transformující růstový faktor beta
Th1	T lymfocyty 1. typu
Th2	T lymfocyty 2. typu
TLR	toll-like receptor
TNFRSF4	TNF receptor superfamily member 4
Tregs	regulační T lymfocyty
v	intimální arteritida (tzv. v-léze)
ZAP70	Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70

2. Úvod

Transplantace ledviny představuje metodu volby v léčbě nezvratného selhání ledvin. Průměrná doba funkce transplantované ledviny je 9-10 let a návrat nemocných do dialyzační léčby je spojen se závažnými medicínskými i ekonomickými důsledky. Hlavní příčinou ztráty funkce transplantované ledviny v dlouhodobém sledování je chronická rejekce (1) a hlavním rizikovým faktorem pro její rozvoj zůstává neefektivně léčená akutní rejekce (2).

Současná histologická Banffská klasifikace rozeznává dva typy akutní rejekce: T buňkami zprostředkovanou (tzv. celulární, TCMR) a protilátkami zprostředkovanou (tzv. humorální, ABMR) (3). Akutní vaskulární rejekce (AVR) je závažný stupeň aloimunitního poškození štěpu, při kterém dochází k infiltraci drobných cév štěpu ledviny zánětlivými elementy. Pro histologický obraz je typická intimální arteritida (tzv. v-léze). V závislosti na stupni arteritidy (v1-v3) dochází k zúžení průsvitu cévy, někdy až k fibrinoidní nekróze stěny cévy a zamezení krevního průtoku. Vzhledem k absenci kolaterálního krevního zásobení v ledvinách pak dochází k ischemii ledvinové tkáně za obstrukcí a k její následné fibrotizaci a ztrátě funkčních vlastností.

Vaskulární rejekce byla původně považována za T buňkami zprostředkovaný proces a dle toho i léčena režimy cílenými na T lymfocyty (tj. steroidy nebo antilymfocytární globulin). Humorální neboli protilátkami zprostředkovaný fenotyp akutní vaskulární rejekce byl připouštěn jen u nejtěžšího stupně arteritidy (v3) a za podmínek splnění ostatních diagnostických kritérií (4). Až později byly identifikovány případy akutní vaskulární rejekce zprostředkované protilátkami bez ohledu na stupeň intimální arteritidy (5). Vysoké riziko selhání štěpu u humorálního fenotypu AVR spočívalo v jeho často mylném označení za celulární proces a použití nevhodné antirejekční léčby cílené na T lymfocyty místo léčby cílené na snížení a zabránění tvorby protilátek.

Revize Banffské klasifikace z r. 2012 uznala intimální arteritidu jakéhokoliv stupně jako jednu ze tří alternativ histologického průkazu akutního poškození tkáně u humorální rejekce (6). Kromě morfologického průkazu akutního poškození tkáně je diagnóza protilátkami zprostředkované rejekce podmíněná i serologickým průkazem dárcovsky specifických protilátek (DSA) a jejich interakce s endotelem. Tato revize Banffské klasifikace nově uznala za průkaz interakce protilátek s endotelem i zvýšenou tkáňovou expresi důkladně validovaných genových transkriptů asociovaných s AMBR. V klinické praxi to znamená, že konvenční morfologický průkaz interakce protilátek s endotelem (C4d pozitivita peritubulárních kapilár nebo mikrocirkulární postižení) lze nahradit vyšetřením genových transkriptů a diagnostikovat tak protilátkami zprostředkovanou rejekci např. i u C4d negativních nálezů.

I přes změny diagnostických pravidel je v klinické praxi někdy obtížné rozlišit mezi dvěma fenotypy rejekce, celulárním a humorálním. Správná diagnóza je přitom nevyhnutelnou podmínkou úspěšné léčby rejekce se zabráněním přechodu do chronicity a selhání štěpu. Molekulární metody představují nástroj ke zlepšení diagnostiky patologických procesů v transplantované ledvině a jejich zavedení je přinejmenším žádoucí u složitých klinických případů po transplantaci ledviny (7). Ve srovnání s konvenční histologií má použití tzv. molekulárního mikroskopu vyšší senzitivitu a specificitu a umí lépe predikovat osud transplantované ledviny (8). Cílem této práce bylo analyzovat klinický průběh akutní vaskulární rejekce a pomocí metod molekulární patologie určit fenotyp akutní rejekce s vaskulárním postižením.

2. Fyziologie imunitního systému

Imunitní systém příjemce je vyzbrojen komplexními a účinnými mechanismy, kterými rozpoznává dárcovský orgán jako cizí a je vůči němu schopen navodit imunitní odpověď – rejekci.

2.1 Vrozená a získaná imunita

Na imunitní odpovědi se podílí imunita vrozená i získaná. Vrozená (přirozená, nespecifická) imunita je součástí staršího nespecifického imunitního systému, který zahrnuje makrofágy, neutrofilny, přirozené zabíječe (NK buňky), cytokiny, buněčné receptory a komplement. Tkáňové poškození nebo infekce mohou spustit řadu zánětlivých procesů, které nevyžadují rozpoznání specifického antigenu, a přesto dokážou indukovat silnou zánětlivou odpověď (9).

Získaná (adaptivní, specifická) imunita zahrnuje T a B lymfocyty, které jsou schopny rozpoznat specifický antigen a navodit imunologickou paměť. T lymfocyty rozpoznávají antigen ve formě peptidu navázaného na proteiny hlavního histokompatibilního systému (MHC) (10). B lymfocyty mají imunoglobulinové receptory, kterými rozpoznávají antigenní části intaktních molekul.

Vrozená a získaná imunita jsou úzce propojeny. Aktivace T lymfocytů vede k produkci a sekreci cytokinů a chemokinů, které dále přitahují jak komponenty vrozené imunity, tak spouštějí specifické mechanismy – produkci protilátek a CD8+ zprostředkovanou cytotoxicitu. A obráceně, pro aktivaci T lymfocytů specifickým antigenem je nevyhnutelná lokální aktivace komplementu, nespecifické složky imunity (11).

2.2 Antigeny HLA systému

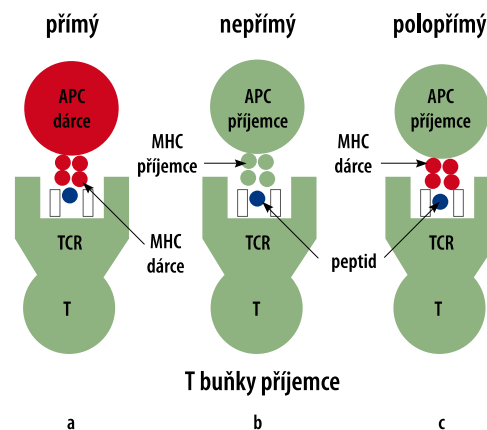
Za rejekci geneticky odlišných tkání jsou odpovědné antigeny histokompatibilního systému, převážně antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). U lidí se MHC antigeny nazývají antigeny HLA systému (12). Ostatní antigeny (minoritní, nonHLA) způsobují obecně slabší rejekci (13). HLA antigeny jsou exprimovány kodominantně, což znamená, že každý jedinec exprimuje na buněčném povrchu obě rodičovské alely pro tyto geny. Alely se dědí v haplotypech, nebo-li v polovičních sadách (po jedné od každého z rodičů). Proto je člověk v MHC komplexu z poloviny identický s rodičem.

HLA antigeny se dělí do 2 skupin. Antigeny I. třídy (HLA-A, B, C) se vyskytují prakticky na všech jaderných buňkách, zatímco antigeny II. třídy (HLA- DR, DQ, DP) se za normálních okolností exprimují pouze na profesionálních antigen-prezentujících buňkách (dendritické buňky, aktivované makrofágy, B lymfocyty). T lymfocyty dokážou rozpoznat antigen, pouze pokud je prezentován v komplexu s HLA molekulou na antigen-prezentující buňce. HLA molekuly I. třídy jsou zodpovědné za prezentaci peptidů

endogenních antigenů (např. intracelulárních virů, nádorových elementů, autoantigenů) CD8+ T lymfocytům, zatímco HLA molekuly II. třídy prezentují peptidy exogenních proteinů (extracelulární bakterie) CD4+ T lymfocytům (12).

2.3 Rozpoznání antigenů

T- lymfocyty příjemce dokážou rozpoznat HLA antigeny prostřednictvím 3 hlavních mechanismů (obr. 1) (14).



Obr. 1: Hlavní mechanismy rozpoznání antigenů dárce. Převzato z (14, 15).

2.3.1 Přímé rozpoznání antigenu

Při přímém způsobu (obr. 1a) rozeznávají T lymfocyty příjemce intaktní HLA antigeny exprimované na dárcovských antigen-prezentujících buňkách (APC), převážně intersticiálních dendritických buňkách přenesených transplantovaným orgánem od dárce. HLA antigeny I. třídy jsou rozeznávány prostřednictvím receptoru (TCR) CD8+ T lymfocytů, zatímco HLA antigeny II. třídy jsou rozeznávány pomocí TCR na CD4+ T lymfocytech. Přímý způsob rozpoznání aloantigenů dominuje v časné aloimunitní odpovědi a je unikátním mechanismem, se kterým se setkáváme jen u transplantací. Proliferace T lymfocytů u příjemce po kontaktu s dárcovskými antigen-prezentujícími buňkami je enormní ve srovnání s množstvím T lymfocytů aktivovaných antigen-prezentujícími buňkami příjemce (nepřímé rozpoznání antigenu), což svědčí o důležité roli této cesty převážně u akutní rejekce štěpu.

2.3.2 Nepřímé rozpoznání antigenu

Při nepřímé cestě (obr. 1b) rozeznávají T lymfocyty příjemce aloantigeny na povrchu antigen-prezentujících buněk příjemce, které migrují do štěpu. APC pak migrují ze štěpu do sekundárních

(periferních) lymfatických orgánů (lymfatické uzliny, slezina), kde jsou HLA antigeny dárce intracelulárně zpracovány a v komplexu s HLA antigeny příjemce předloženy CD4+ T lymfocytům. Tento způsob rozpoznání antigenu se zásadně neliší od klasické prezentace jakéhokoliv cizorodého antigenu. Rozpoznání antigenů přímou cestou dominuje v prvních týdnech po transplantaci, kdy ve štěpu ještě přežívají dárcovské antigen-prezentující buňky. S úbytkem dárcovských APC dochází k převaze nepřímé cesty rozpoznání antigenů díky neustálému přísunu antigen-prezentujících buněk příjemce. I proto se tento typ imunitní odpovědi uplatňuje v patogenezi chronické nebo pozdní akutní rejekce a je spojen s reakcí T lymfocytů na podstatně variabilnější repertoár peptidů (14).

2.3.3 Polopřímé rozpoznání antigenu

Může se stát, že mezibuněčným kontaktem dojde k přesunu fragmentů intaktní membrány dárcovské APC na APC příjemce. Při této „polopřímé“ cestě (obr. 1c) rozeznává T lymfocyt dárcovský komplex aloantigen – MHC molekula na APC příjemce (14).

3. Rozdělení rejekce po transplantaci ledviny

Rejekce (odhojení) je složitý proces, při kterém je imunitní systém příjemce schopen rozpoznat transplantovaný orgán a navodit vůči němu autoimunitní odpověď s poškozením. I když jsou pro vznik rejekce nejrizikovější první 3 měsíce, může vzniknout v kterémkoliv období po transplantaci. Klinicky rozeznáváme rejekci akutní a chronickou (15).

Akutní rejekce se obvykle vyskytuje v prvních 3-6 měsících po transplantaci. Označení hyperakutní rejekce by se již nemělo používat, jelikož se jedná o akutní protilátkami zprostředkovanou rejekci v přítomnosti preformovaných protilátek proti štěpu. V minulosti k ní docházelo během několika minut až hodin po orgánové transplantaci. V současné době se po transplantaci ledvin s hyperakutní rejekcí neseťkáváme díky pokrokům v diagnostice imunologického rizika příjemce a provádění transplantace jen při negativní cytotoxické křížové zkoušce a respektování kompatibility v antigenech krevních skupin (16).

Chronická rejekce se vyvíjí v průběhu měsíců až let po transplantaci. Zatímco moderní imunosuprese vedla ke snížení incidence akutní rejekce a zlepšení krátkodobých výsledků transplantací, výskyt chronické rejekce a dlouhodobé přežití štěpu zůstává stejné (17). V důsledku chronické rejekce dochází k progresi fibrózy a k jizvení v transplantované ledvině, postupné progresi proteinurie, hypertenze, renální dysfunkce až selhání transplantované ledviny (18).

Z pohledu patofyziologie a dominantní výkonné složky imunity lze rozlišovat rejekci zprostředkovanou T buňkami (TCMR), protilátkami (ABMR) a smíšenou.

4. Patofyziologie rejekce

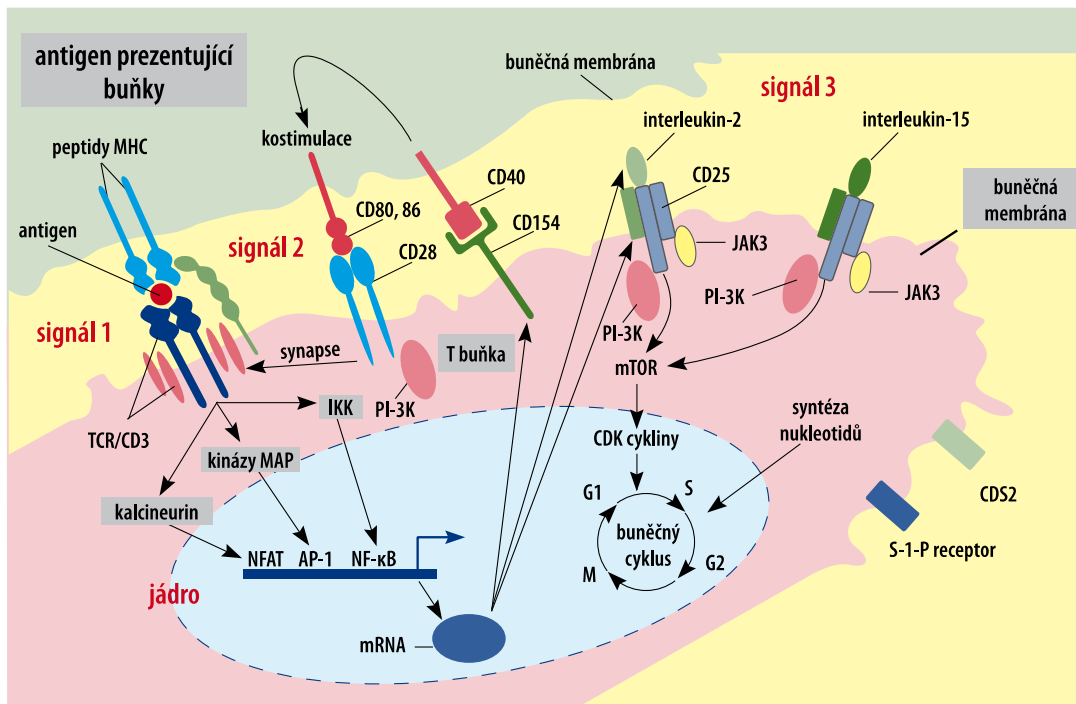
Imunitní alogenní odpověď sestává z buněčné (T lymfocyty zprostředkované) a humorální (protilátkami zprostředkované) odpovědi. Ačkoli se na rejekci podílejí i jiné typy imunokompetentních buněk, T lymfocyty hrají ústřední roli. Rejekce se skládá z fáze senzibilizace a efektorové fáze.

4.1 Fáze senzibilizace

4.1.1 Imunitní rozpoznání antigenů dárce, aktivace T lymfocytů

V této fázi, CD4+ a CD8+ T lymfocyty rozpoznávají prostřednictvím svých receptorů aloantigeny exprimované na buňkách štěpu. K rozpoznání antigenu jsou potřebné 2 signály. První signál je zabezpečen interakcí mezi receptorem T lymfocytu (TCR) a antigenem prezentovaným MHC molekulou na antigen-prezentující buňce (19). Druhý signál je zabezpečen prostřednictvím interakce mezi kostimulačním receptorem T lymfocytu a ligandem na povrchu antigen-prezentující buňky (obr. 2). Nejznámější z kostimulačních signálů je interakce mezi CD28 na buněčném povrchu T lymfocytu a povrchovými ligandy APC buňky, B7-1 (CD80) nebo B7-2 (CD86). Tento kostimulační signál patří mezi aktivační (posiluje imunitní rozpoznání). Naváže-li se na stejné ligandy APC buňky cytotoxický T lymfocytární antigen (CTLA- 4) na T lymfocytu, vznikne inhibiční kostimulační signál. Mezi další kostimulační molekuly patří CD40 na APC a jeho ligand CD40L (CD154) na T lymfocytu. Kostimulace je důležitá jak pro aktivaci, tak pro přežití T lymfocytů. Bez dostatečné kostimulace dochází místo aktivace T lymfocytů k nastartování pochodů vedoucích k apoptóze (19). Na blokádě kostimulace je založen např. imunosupresivní účinek belataceptu (20).

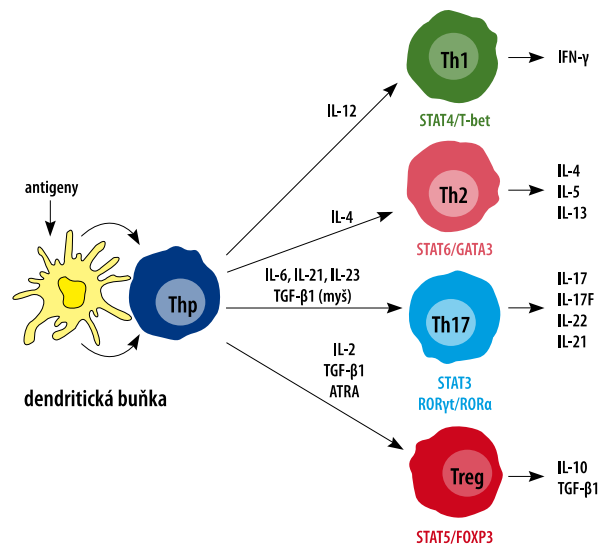
Kostimulační signály aktivují tři signální transdukční dráhy: kalcium-kalcineurinovou dráhu, dráhu pro MAP kinázu a dráhu pro proteinkinázu C, které dále aktivují transkripční faktory – nukleární faktor aktivovaných T lymfocytů (NFAT), aktivační protein 1 (AP-1) a nukleární faktor B (NF- κ B). To vede k expresi CD 154 (a další aktivaci antigen-prezentujících buněk), α – řetězce receptoru pro IL- 2 (CD25) a interleukin-2. Receptory pro řadu cytokinů (IL-2, 4, 7, 15 a 21) mají společný γ řetězec, na který se váže Janusova kináza (JAK3). IL 2 a IL- 15 spouštějí signál 3, nevyhnutelný pro proliferaci T lymfocytů. Prostřednictvím dráhy pro fosfoinozimid- 3-kinázu (PI-3K) a dráhy pro mTOR dochází k iniciaci buněčného cyklu a nevyhnutelné syntéze purinových a pyrimidinových nukleotidů, kontrolované inozinmonofosfátdehydrogenázou (IMPDH) a dihydroorotátdehydrogenázou (DHODH) (21).



Obr. 2: Tři signály potřebné k aktivaci T lymfocytů. Převzato z (15, 21).

4.1.2 Proliferace a diferenciace T lymfocytů

Stimulované naivní T lymfocyty produkují IL-2, autokrinní růstový faktor, který podporuje jejich proliferaci a následnou diferenciaci a získání efektorových schopností. V závislosti na přítomném cytokinovém prostředí se T lymfocyty diferencují do různých typů efektorových lymfocytů a produkují různé typy cytokinů (obr. 3) (22). Aktivované T lymfocyty vystavené IL-12 se diferencují na T lymfocyty 1. typu (Th1) a produkují převážně IFN- γ , zatímco T lymfocyty exponované IL-4 se diferencují na T lymfocyty 2. typu (Th2) a produkují IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. Expozice TGF- β a IL-6 vede k diferenciaci na Th17 lymfocyty a produkci IL-17, IL-22, IL-21 (23). Dojde-li k aktivaci naivních T lymfocytů v přítomnosti TGF- β a IL-2, dochází k diferenciaci na indukované (adaptivní) T regulační lymfocyty (Tregs), které dokážou potlačit imunitní odpověď a pomoci navodit toleranci (24, 25). Akutní rejeckce je nejvíc spojena s produkcí IFN- γ T lymfocytů 1. typu, i když v poslední době nabývá na významu produkce IL-17 buňkami Th17 a cytokinů Th2 buňkami.



Obr. 3: Diferenciace T lymfocytů v závislosti na cytokinovém prostředí. Převzato z (15, 22).

4.2 Efektorová fáze alospecifické odpovědi

Aktivované T lymfocyty přestupují z lymfatických uzlin do krevní cirkulace a infiltrují zánětlivou tkáň. Efektorové T lymfocyty aktivují získanou imunitní odpověď a ohrožují transplantovaný orgán akutní rejekcí. Dominují-li mechanismy humorální imunity, dochází ke vzniku akutní protilátkami zprostředkované rejekce. Uplatnění mechanismů buněčné imunity vede k navození akutní T buňkami zprostředkované rejekce (26).

4.2.1 Hyperakutní rejekce

U hyperakutní rejekce dochází díky rychlé destrukci cév k odhojení transplantované tkáně během několika minut až hodin. Hyperakutní rejekce je zprostředkovaná humorální imunitou a vzniká v přítomnosti preformovaných protilátek proti štěpu, a to po předchozích krevních převodech, těhotenstvích, transplantacích u příjemce. Komplexy antigen – protilátka aktivují komplement, vedou k masivní trombotizaci kapilár a poškození perfúze štěpu.

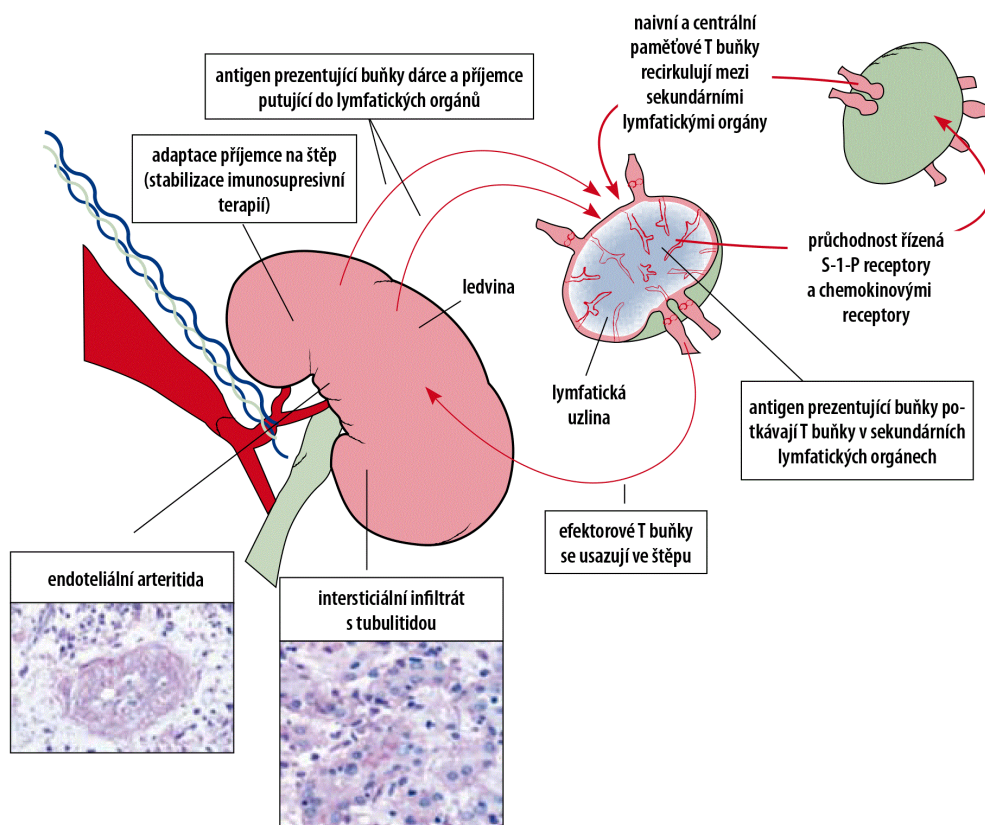
4.2.2 Akutní rejekce

4.2.2.1 Akutní T buňkami zprostředkovaná rejekce

Po rozpoznání alopeptidů prezentovaných antigen prezentujícími buňkami v lymfatických uzlinách, infiltrují efektorové T lymfocyty transplantovaný orgán, poškozují endotel a omezují perfúzi (obr. 4)(21). Cytolytický účinek T lymfocytů je založen na tvorbě cytotoxických granulí s obsahem perforinu a granzymu. Po rozpoznání cílové buňky dochází k fúzi granulí s buněčnou membránou efektorové buňky a vyloučení obsahu do imunologické synapse. Dosud neznámým mechanismem je granzym

vložen do cytoplazmy cílové buňky, kde může spustit apoptózu pomocí několika různých mechanismů. Jsou to zejména alospecifické CD8+ T lymfocyty, které jsou namířené proti endotelovým buňkám štěpu, hlavním cílovým buňkám celulární rejekce. CD4+ T lymfocyty většinou pomáhají CD8+ T lymfocytům získat jejich efektorové schopnosti. HLA antigeny 1. třídy mohou být terčem cytotoxických T lymfocytů prakticky okamžitě, zatímco k expresi HLA antigenů 2. třídy (a současně adhezních a kostimulačních molekul) na endotelu a parenchymových buňkách dochází až po indukci prozánětlivými cytokiny a IFN- γ . Taková prezentace antigenů vede k „přilákání“ dalších T lymfocytů a posílení rejekčních dějů (21). Nejsou-li na buňkách endotelu nebo parenchymu transplantovaného orgánu exprimované kostimulační ligandy, dochází k inaktivaci a úmrtí T lymfocytů. K potlačení aloimunitní odpovědi mohou přispět také regulační T lymfocyty a to např. zamezením rozpoznání antigenu v sekundárních lymfatických orgánech nebo inhibicí efektorové fáze ve štěpu (15).

I když klíčovou roli v akutní rejekci hraje T buněčná odpověď, předchází ji up-regulace prozánětlivých mediátorů ve štěpu. K této časně zánětlivé odpovědi dochází hned po transplantaci a představuje vrozenou odpověď na tkáňové poškození nezávislé na adaptivní imunitě. Několik studií zkoumalo roli agonistů a signálů Toll-like receptorů (TLR) při aloimunitním rozpoznání a rejekci. Tyto mechanismy vrozené imunity nedokáží samy o sobě vést k rejekci, ale jsou důležité pro optimální odpověď adaptivní imunity a hrají významnou roli v rezistenci při pokusech o navození tolerance (27).



Obr. 4: T buňkami zprostředkovaná rejekce. Převzato z (15, 21).

4.2.2.2 Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce

Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce je poškození štěpu zprostředkované především protilátkami a komplementem. ABMR 1. typu se většinou objeví časně po transplantaci, jelikož se na jejím vzniku podílí již předem vytvořené (preformované) protilátky. U ABMR 2. typu hrají roli protilátky, které vzniknou *de-novo* po transplantaci.

Primárním terčem protilátkami zprostředkované rejekce je endotel štěpu, kde jsou konstitutivně exprimovány HLA antigeny 1. třídy, zatímco HLA antigeny 2. třídy nejsou na endotelu za normálních okolností exprimovány. Kromě HLA protilátek se při ABMR mohou uplatnit i nonHLA protilátky, v případě transplantace ledviny se může jednat o protilátky MICA, MICB, protilátky proti receptoru pro angiotensin 1, proti kolagenu V, vimentinu apod. Protilátky (převážně IgG), které mají schopnost indukovat ABMR, zpravidla aktivují komplement. To má přímý cytotoxický dopad na buňky transplantovaného orgánu, vede k produkci zánětlivých mediátorů, aktivaci koagulačních a fibrinolytických systémů a následně k vasokonstrikci, edému a obturaci cév tromby (28).

4.2.3 Chronická rejekce

Chronická rejekce se vyvíjí v průběhu měsíců až let po transplantaci. V patofyziologii chronické rejekce se uplatňují mechanismy zprostředkované T-lymfocyty nebo protilátkami, příp. jejich kombinace. Důsledkem chronické rejekce je obecně progresse fibrózy a jizvení v transplantovaném orgánu (18).

5. Epidemiologie a rizikové faktory rejekce

Zavedení potentní imunosuprese do indukční a udržovací léčby vedlo k signifikantnímu snížení výskytu akutní rejekce po transplantaci ledviny. V současné době je incidence akutní rejekce ve většině transplantčních center kolem 8 % (29). Akutní rejekce vzniká nejčastěji v prvních 3 měsících po transplantaci ledviny. Ve většině případů se jedná o rejekci zprostředkovanou T buňkami, v cca 10 % o rejekci zprostředkovanou protilátkami.

I přes významné pokroky v léčbě, zůstává akutní rejekce jedním z hlavních rizikových faktorů rozvoje chronické rejekce, hlavním determinantem předčasného selhání transplantované ledviny. Proto je ve snaze transplantologů akutní rejekci předcházet. Snahy o snížení výskytu rejekce by měly být založeny především na znalosti rizikových faktorů rejekce, důkladném posouzení imunologického rizika příjemce před transplantací, vhodném výběru dárce a adekvátní imunosupresivní léčbě.

Mezi hlavní rizikové faktory vzniku rejekce patří:

- **pozitivní křížová zkouška** (tzv. crossmatch) - cytotoxická křížová zkouška (CDC CM) je prováděna za účelem posouzení kompatibility v HLA systému mezi dárce a příjemcem – vyšetřuje se reaktivita mezi lymfocyty dárce a sérem příjemce. Vyšetření provádí HLA laboratoř před každou transplantací. Pozitivní CDC křížová zkouška znamená přítomnost preformovaných protilátek proti HLA, které by mohly vést k rozvoji hyperakutní rejekce (30). Pozitivita klasické CDC křížové zkoušky se v našem centru považuje za absolutní kontraindikaci transplantace ledviny. Křížová zkouška provedená průtokovou cytometrií (FACS CM) je mnohonásobně citlivější než klasická CDC a detekuje i necytotoxické protilátky, které nevážou komplement (31, 32). V našem centru provádíme FACS CM u pacientů před transplantací ledviny od žijícího dárce nebo u pacientů ve vysokém imunologickém riziku. Pozitivita FACS CM nepředstavuje absolutní kontraindikaci k transplantaci ledviny (33).
- **přítomnost dárcovsky-specifických protilátek (DSA)**- tj. anti HLA protilátek v séru příjemce namířených proti HLA antigenům konkrétního dárce. Nejcitlivější metodu pro jejich detekci je LUMINEX. Riziko tvorby HLA protilátek představují předchozí transplantace, anamnéza rejekce, podání krevních derivátů, těhotenství (34).
- **vysoké panel reaktivní protilátky (PRA)** – vyšetření séra příjemce s lymfocyty 50 až 100 dárců z populace pomocí klasické CDC metodiky (angl. complement-dependent cytotoxicity). Provádí se v pravidelných kvartálních intervalech u pacientů zařazených na čekací listině. Udává se v procentech pozitivní reakce a vyjadřuje reaktivitu séra příjemce vůči panelu vybraných dárců, jehož složení HLA antigenů odpovídá frekvenci v dané populaci. Jinými slovy tento test nepřímo vyjadřuje pravděpodobnost pozitivní křížové zkoušky s aktuálním dárce. Vyšší procento PRA

znamená vyšší imunologické riziko příjemce. Pacienti ve vysokém imunologickém riziku vyžadují silnější imunosupresivní léčbu včetně úvodního podání depleční indukční protilátky (např. antithymocytárního globulinu).

- **neshoda v HLA antigenech** – po vyšetření HLA typizace tkáně dárce a příjemce se zjišťuje míra shody v antigenech HLA – A, B, DR, případně DQ, DP. Riziko rejekce stoupá s mírou neshody (35).
- **ABO inkompatibilní transplantace** – při transplantaci se dodržuje kompatibilita v antigenech krevní skupiny. Za určitých podmínek, po speciální přípravě příjemce a při vhodném načasování, je možné provést i ABO inkompatibilní transplantaci ledvin od žijícího dárce (36).
- **opožděný rozvoj funkce štěpu (DGF)** – po transplantaci ledviny je opožděný rozvoj funkce ledviny definován jako potřeba dialýzy v prvních 2 týdnech po transplantaci. Nejčastější příčinou DGF je akutní tubulární nekróza jako důsledek dlouhé doby studené ischemie (tj. doby od promývání ledviny reperfúzním roztokem po odběru od dárce do doby obnovení krevního průtoku ledvinou v těle příjemce). Podíl na opožděném rozvoji funkce štěpu může mít horší kvalita ledviny od tzv. marginálního neboli ECD dárce (37) a ischemicko/reperfúzní poškození.
- **nevhodná minimalizace imunosuprese** (např. vysazení kortikoidů, nízké hladiny kalcineurinových inhibitorů, redukce dávky mykofenolát mofetilu) (38-40)
- **noncompliance při užívání imunosuprese** (41)
- **infekce** – např. virové infekce podporují indukci paměťových T – lymfocytů, které zkříženě reagují s alogenním hlavním histokompatibilním komplexem (MHC). Tato zkřížená senzitivita se nazývá heterologní imunita (42).
- **Afro-Americká rasa** (43)
- **dětský příjemce** (44)

Mezi protektivní faktory, které snižují riziko rejekce, patří nulová neshoda v HLA antigenech mezi dárce a příjemcem (tj. plná shoda, tzv. full-house v antigenech HLA-A, -B, -DR), preemptivní transplantace (tj. transplantace ledviny před zahájením dialyzačního léčení), transplantace ledviny od žijícího dárce, 1. transplantace, vyšší věk příjemce (nižší riziko vzniku rejekce se předpokládá díky klesající síle imunitní odpovědi u starších příjemců) (28).

6. Klinická manifestace akutní rejekce

Akutní rejekce transplantované ledviny může, hlavně v časném stadiu, probíhat asymptoticky. Mezi nespecifické projevy akutní rejekce patří subfebrílie, horečka, zimnice, slabost, malátnost, únava, nevolnost, nauzea až zvracení, nechutenství, bolest hlavy, citlivost až bolest v místě transplantované ledviny. Nejčastějším projevem je akutní zhoršení renální funkce, v těžší formě doprovázené oligurií s rozvojem otoků, nárůstem hmotnosti, dušností nebo až anurickým selháním funkce. Častým doprovodným jevem je dekompenzace hypertenze.

Laboratorní vyšetření prokáže elevaci renálních parametrů, tj. nárůst sérového kreatininu a urey. K monitoraci renální funkce v časném období po transplantaci upřednostňujeme vyšetření sérového kreatininu před kreatinovou clearancí (ClCr) nebo odhadovanou glomerulární filtrací (eGFR), která má nesporný význam v pozdějším období po transplantaci. Podezření na rejekci vzbuzuje i nejasná elevace CRP. Vyšetření moči může prokázat proteinurii, typicky se objevuje spíše u chronické rejekce (45).

Zobrazovací metody mají v diagnostice akutní rejekce pomocný význam. Při sonografickém vyšetření lze zaznamenat změnu velikosti a echogenity štěpu ledviny. Může dojít ke zhoršení perfúze štěpu se zvýšeným rezistenčním indexem. Relevantnější než izolované měření rezistenčního indexu je dynamický vývoj v čase. Sonografický obraz akutní rejekce nelze odlišit od akutní tubulární nekrózy. Definitivní diagnóza je vždy založena na histologickém vyšetření vzorků ledvinné tkáně získané biopsí (46).

7. Diagnostika akutní rejekce

Základem diagnostiky rejekce je biopsie transplantované ledviny s odběrem tkáně k histopatologickému vyšetření světelným mikroskopem, imunohistochemickému nebo imunofluorescenčnímu vyšetření, příp. dodatečnému vyšetření elektronovým mikroskopem (47). Většina akutních rejekcí je zjištěna cestou tzv. indikační biopsie provedené při suspekci na rejekci na základě klinických symptomů, laboratorních nebo zobrazovacích vyšetření. Je-li rejekce diagnostikována z tzv. protokolární biopsie (tj. předem naplánované biopsie v určitém časovém intervalu) při absenci jiných klinických projevů rejekce, je označována za rejekci subklinickou (48). Většina transplantačních center, včetně našeho, provádí protokolární biopsii v 3. měsíci. V některých centrech je prováděná protokolární biopsie v 1. roce po transplantaci anebo se provádí opakované protokolární biopsie i v pozdějším období po transplantaci s cílem odhalit chronické poškození transplantované ledviny (49).

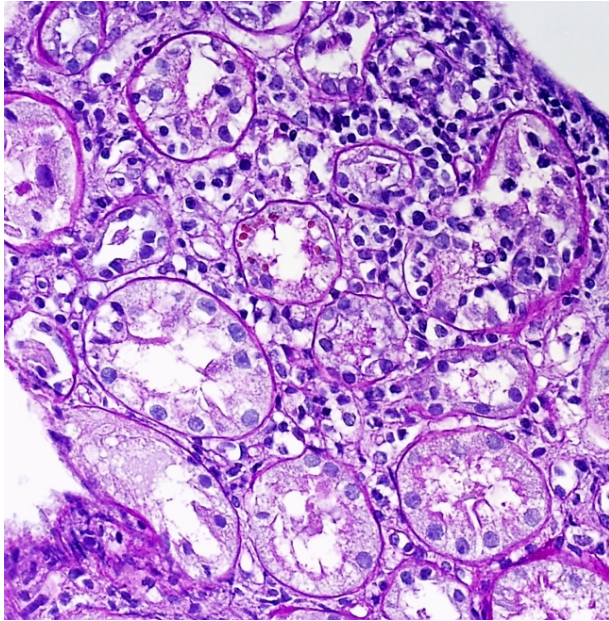
7.1 Histologická klasifikace a sérologie

7.1.1 Akutní T buňkami zprostředkovaná rejekce

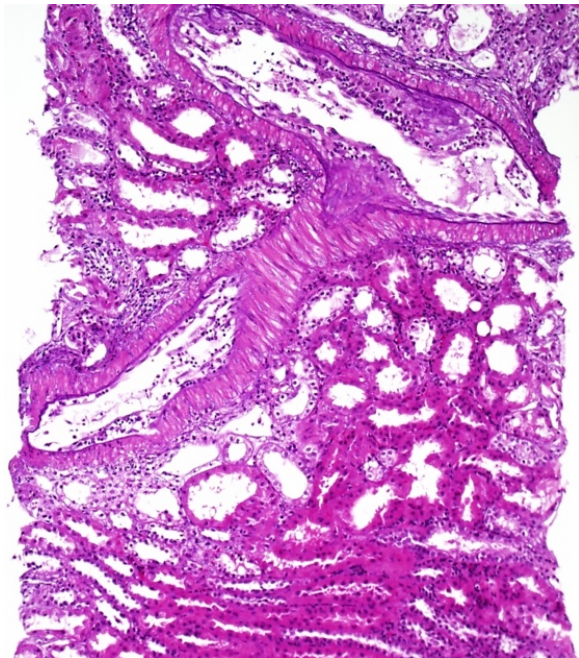
V diagnostice akutní T buňkami zprostředkované rejekce hraje roli přítomnost a rozsah zánětlivé celulizace v intersticiu ledvinné kůry (skóre i), přítomnost lymfocytů v epitelu tubulů, tzv. tubulitida (skóre t) a zánětlivé postižení arterií, tzv. arteritida (skóre v).

Rozsah morfologických znaků se hodnotí pomocí jednotlivého skóre na stupnici 0-3. Přítomnost intersticiálního zánětu (i) a tubulitidy (t) charakterizuje akutní TCMR typ I (A nebo B, podle rozsahu postižení) (Obr. 5). Pro diagnózu akutní TCMR typ II je nezbytná přítomnost mírné až těžké intimální arteritidy (v1-v2) (Obr. 6). Případy s nejtěžším stupněm arteritidy (v3) jsou klasifikovány jako akutní TCMR typ III (Obr. 7).

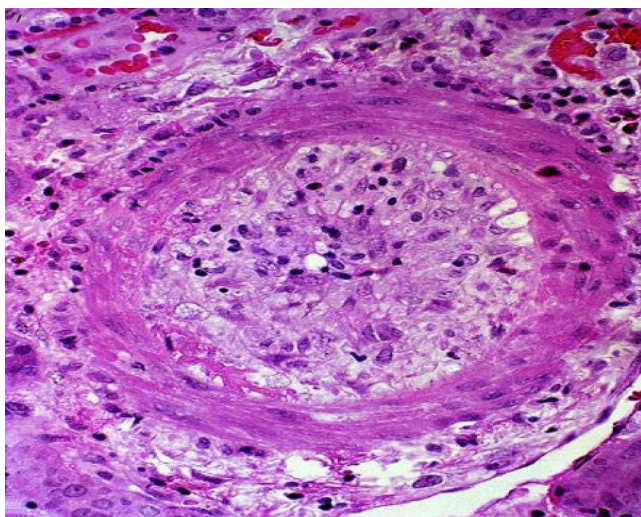
Za akutní vaskulární T buňkami zprostředkovanou rejekci se považuje rejekce s intimální arteritidou bez ohledu na její stupeň (v1-v3), tj. TCMR 2. a vyššího typu. Detailní popis typů akutní TCMR na základě přítomnosti jednotlivých morfologických znaků v biopsii štěpu ledviny dle aktuálně platné histologické Banffské klasifikace uvádí tabulka 1 (3).



Obr. 5. Akutní T buňkami zprostředkovaná rejekce typ I. V histologickém obrazu renální tkáně je patrný bohatý tubulointerstiální infiltrát (Zdroj: Doc. E. Honsová, IKEM).



Obr. 6. Akutní T buňkami zprostředkovaná rejekce typ II. Histologický preparát renální tkáně zobrazuje těžkou intimální arteritidu 2. stupně (v2) (Zdroj: Doc. E. Honsová, IKEM).



Obř. 7. Akutní T buňkami zprostředkovaná rejekce typ III. V histologickém obrazu renální tkáně je viditelná transmurální arteritida (v3) (Zdroj: Doc. E. Honsová, IKEM).

IA	Významná zánětlivá celulizace intersticia postihující > 25 % nesklerotické kortikální tkáně (i2 nebo i3) a středně těžká tubulitida (t2) v minimálně 1 tubulu, s výjimkou těžce atrofických tubulů
IB	Významná zánětlivá celulizace intersticia postihující > 25 % nesklerotické kortikální tkáně (i2 nebo i3) a těžká tubulitida (t3) v minimálně 1 tubulu, s výjimkou těžce atrofických tubulů
IIA	Mírná až středně těžká intimální arteritida (v1, tj. lymfoidní elementy pod endotelem v nejméně jedné artérii), bez ohledu na přítomnost intersticiálního zánětu (i) a tubulitidy (t)
IIB	Těžká intimální arteritida (v2, tj. lymfoidní elementy pod endotelem vytvářející >25 % stenózu lumenu v nejméně jedné artérii bez ohledu na přítomnost intersticiálního zánětu (i) a tubulitidy (t)
III	Transmurální arteritida a/nebo fibrinoidní nekróza stěny doprovázená zánětlivou monocytární intimální arteritidou (v3) bez ohledu na přítomnost intersticiálního zánětu (i) a tubulitidy (t)

Tabulka 1. Definice typů akutní TCMR dle revize Banffské klasifikace z r. 2017. Zkratky: i, intersticiální zánět; t, tubulitida; v, arteritida. Převzato z (3).

Případy suspektní z akutní TCMR, které svým rozsahem nesplňují diagnostická kritéria akutní T buňkami zprostředkované rejekce, jsou klasifikovány jako hraniční změny (borderline changes). Jedná

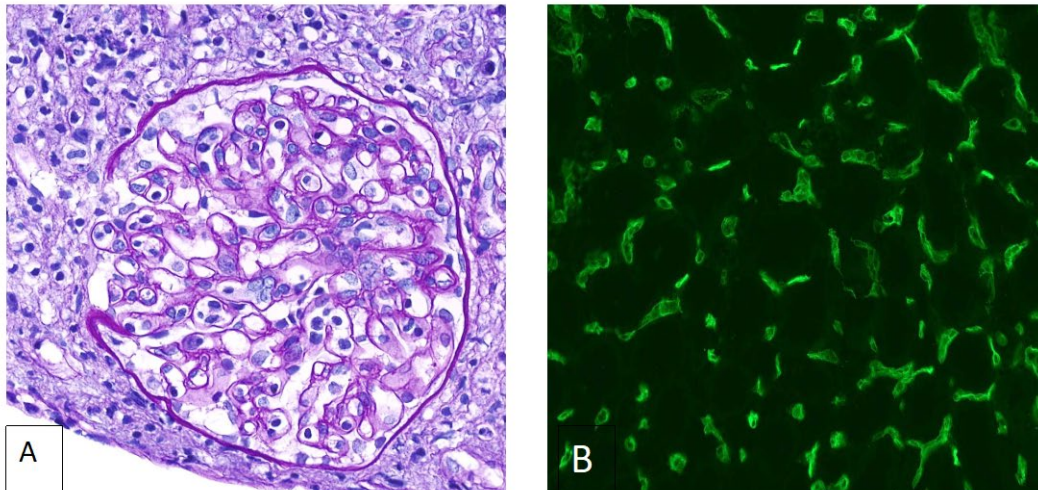
se o případy bez intimální nebo transmuralní arteritidy ($v = 0$) s přítomnou tubulitidou ($t > 0$) a mírným intersticiálním zánětem ($i0$ nebo $i1$), nebo se středně těžkým intersticiálním zánětem ($i2$ nebo $i3$) a mírnou tubulitidou ($t1$) nebo s mírným intersticiálním zánětem ($i1$) a tubulitidou ($t > 0$).

7.1.2 Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce

Protilátkami zprostředkovaná rejekce je relativně vzácnou komplikací po transplantaci ledviny, často ale s fatálními důsledky pro štěp (28, 50). Poškození štěpu u ABMR je zprostředkováno především protilátkami a komplementem (51). Při suspekci na akutní protilátkami zprostředkovanou rejekci je histologické vyšetření tkáně ledviny doplněno o sérologické vyšetření HLA, příp. i nonHLA protilátek a křížovou zkoušku (28, 52-54).

Diagnóza akutní ABMR je založena na

- **histologickém průkazu akutního poškození tkáně** – zánět v peritubulárních kapilárách (skóre ptc), glomerulitida (skóre g), arteritida (skóre v), trombotická mikroangiopatie (TMA) (obr. 8A).
- **průkazu interakce protilátek s endotelem** – ve většině případů se jedná o pozitivitu C4d v biopsii, tj. otisk aktivace klasické cesty komplementu v peritubulárních kapilárách (obr. 8B). C4d pozitivita ale není nevyhnutelnou podmínkou diagnostiky ABMR. Dle současně platné klasifikace může být nahrazena mikrovaskulárním zánětem nebo expresí genů specifických pro ABMR.
- **sérologickém průkazu dárcovsky specifických protilátek** – v praxi se jedná o průkaz dárcovsky specifických HLA nebo non HLA protilátek metodou Luminex a pozitivní výsledek cytotoxické (CDC) nebo průtokové křížové zkoušky (FXCM), tzv. „crossmatch“. Někdy je obtížné dárcovsky specifické protilátky z různých důvodů prokázat. Pro tyto případy zavádí revize Banffské klasifikace z r. 2017 výjimku (viz Tabulka 2) (3).



Obr. 8. Akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce. A) Glomerulitida jako součást histologického obrazu ABMR ve světelné mikroskopii. B) Imunoflourescenční detekce C4d v peritubulárních kapilárách jakou součást ABMR. (Zdroj: Doc. E. Honsová, IKEM).

1. Histologický průkaz akutního poškození tkáně (musí být splněn min. 1 bod)

- mikrovaskulární zánět ($g > 0$ a/nebo $ptc > 0$), po vyloučení rekurence nebo de-novo glomerulonefritidy. V přítomnosti akutní TCMR, hraničních změn nebo infekce je samotné $ptc \geq 1$ nedostatečné, g musí být ≥ 1 .
- intimální nebo transmurální arteritida ($v > 0$)
- akutní trombotická mikroangiopatie (po vyloučení jiných příčin TMA)
- akutní tubulární poškození (po vyloučení jiných zjevných příčin)

2. Průkaz současné nebo nedávné interakce protilátek s cévním endotelem (musí být splněn min. 1 bod)

- lineární C4d pozitivita v peritubulárních kapilárách (C4d2 nebo C4d3 metodou imunoflourescence na zmražených řezech nebo C4d > 0 stanovené imunohistochemicky na parafínových řezech)
- nejméně středně těžký mikrovaskulární zánět ($[g + ptc] \geq 2$) po vyloučení rekurence nebo de-novo glomerulonefritidy. V přítomnosti akutní TCMR, hraničních změn nebo infekce je samotné $ptc \geq 2$ nedostatečné, g musí být ≥ 1 .
- zvýšená tkáňová exprese důkladně validovaných genových transkriptů asociovaných s ABMR

3. Sérologický průkaz dárcovsky specifických protilátek (HLA nebo non HLA)

Nepodaří-li se prokázat DSA v séru, může být průkaz DSA protilátek nahrazen pozitivitou C4d nebo expresí validovaných genových transkriptů.

Tabulka 2. Definice akutní ABMR dle revize Banffské klasifikace z r. 2017. Ke stanovení diagnózy musí být splněna všechny 3 diagnostická kritéria. Zkratky: C4d, produkt degradace složky komplementu C4; DSA, dárcovsky specifické protilátky; g, glomerulitida; ptc, peritubulární kapilaritida; TMA, trombotická mikroangiopatie; v, arteritida. Převzato z (3).

7.1.3 Limitace histologického vyšetření a vyšetření dárcovsky specifických protilátek v diagnostice akutní rejekce

Renální biopsie je považována za zlatý standard v diagnostice patologických procesů v transplantované ledvině. Až u 40 % pacientů vede výsledek histologie ke změně předpokládané etiologie akutní a chronické dysfunkce štěpu a k úpravě léčby. I přesto má histologické vyšetření řadu limitací. Jednou z nich je reprezentativní charakter vyšetřovaného vzorku. Například u onemocnění fokálního charakteru, jakým je BKV nefropatie, nemusí být onemocnění v biopsickém vzorku vůbec zachyceno. Naopak, fokální histologický nález fibrózy v jizvě nemusí odpovídat skutečnému stavu ve zbytku renální tkáně (55).

Diagnostika patologických procesů v transplantované ledvině pomocí histologického vyšetření je dále ztížena vývojem onemocnění v čase. Nálezy kolísají od incipientních diagnostických lézí až po nespecifické pokročilé nálezy. Zatímco časná biopsie může prokázat diskrétní lézi, pozdě provedená biopsie může naléznout již jen nespecifickou intersticiální fibrózu a tubulární atrofii bez možnosti zjištění vyvolávající příčiny. Pro biopsii dlouhou dobu po transplantaci je typický nález více patologických procesů. Není výjimkou souběh arteriosklerózy, fibrózy, chronické rejekce, příp. i rekurence základního onemocnění. Je pak na spolupráci klinika a patologa, aby rozhodli, který proces je dominantní příčinou dysfunkce ledviny a stojí za to ho terapeuticky ovlivnit.

Histologickou diagnostiku ztěžuje i poměrně častá úprava diagnostických kritérií Banffské klasifikace. Slabým místem je i ztráta části informací daná dichotomickým charakterem používaného histologického skóre na škále 0 až 3. Nezanedbatelná je i velká míra subjektivity při hodnocení

histologického nálezu, nízká reproducibilita (56), nedostatek zkušených patologů, neadekvátní velikost histologického vzorku a heterogenita tkáně (kůra vs. dřevina) (55).

LUMINEX je vyšetření anti HLA protilátek v séru příjemce založené na měření průměrné fluorescenční intenzity (MFI, z angl. mean fluorescence intensity) fotonů emitovaných ze specifických kuliček s navázanými HLA proteiny (57). Tento sérový průkaz dárcovsky specifických protilátek (DSA) vedl k významnému zlepšení diagnostiky ABMR. Jeho slabou stránkou je nedostatečná validace a značná variace mezi centry. Problematické zůstává i určení patogenicity jednotlivých DSA (58-60). Banffská klasifikace sice rozděluje DSA na pozitivní a negativní, ale problematika DSA je více komplexní. U patogenicity protilátek záleží na jejich množství, podtřídě, cílovém antigenu, vazbě na komplement. Např. u nízkého titru dárcovsky specifických protilátek 1. třídy bez vazby na komplement (C1q negativní), je ve srovnání s *de-novo* C1q pozitivními DSA protilátkami 2. třídy málo pravděpodobné, že se jedná o patogenní protilátky (61). Přitom oba dva příklady protilátek jsou dle Banffské klasifikace považovány za DSA pozitivní. Výše uvedený příklad reflektuje skutečnost, že u některých pacientů nevede ani mnohaletá přítomnost DSA protilátek k rozvoji rejekce či progresi renální dysfunkce (62), zatímco u jiných pacientů se zjevnou protilátkami zprostředkovanou rejekcí nemusí být DSA z technických příčin či z důvodu přítomnosti neznámých protilátek vůbec detekovány.

Z výčtu limitací konvenční histologie a sérového vyšetření DSA je zřejmé, že zlepšení diagnostiky chorobných procesů po transplantaci ledviny vyžaduje zavedení pokročilého nástroje do klinické praxe.

7.2 Možnosti molekulární patologie v diagnostice akutní rejekce

Molekulární vyšetření tkáně nabízí způsob, jak ve srovnání s histologickým vyšetřením zpřesnit diagnostiku patologických procesů. Molekulární fenotypizace byla nejdříve úspěšně aplikována v onkologii (63) a stala se součástí běžné klinické praxe, např. při léčbě rakoviny prsů (64). V péči o pacienty po transplantaci ledviny představuje pomocný diagnostický nástroj ke stávajícímu konvenčnímu histologickému vyšetření. Vyšetření je založeno na měření genové exprese, tj. hladině messengerové mRNA ve vzorku renální tkáně pomocí metody microarray a korelaci tohoto transkriptomu s klinickým fenotypem renálního poškození. Rozvoj molekulární patologie vedl k vývoji diagnostického systému na bázi molekulárního mikroskopu (MMDx, z angl. Molecular microscope diagnostic system), který dopomohl k objevení nových fenotypů renálního poškození a zlepšení stratifikace rizika (65). V současnosti je již definováno molekulární skóre pro T buňkami (TCMR) a

protilátkami zprostředkovanou rejekci (ABMR), akutní renální poškození (AKI), intersticiální fibrózu a tubulární atrofii (IF/TA) (66).

V praxi je potřebné vzorek kůry ledviny získaný biopsií umístit do stabilizačního roztoku (RNA later®). Následně se extrahuje RNA. Po splnění předem definované kvality se přistupuje k vyšetření technikou microarray – hybridizaci, barvení a skenování RNA. Surová microarray data se normalizují k referenční databázi a provádí se složité statistické analýzy (např. analýza hlavních komponent, analýza nejbližšího souseda) s cílem přiřadit vyšetřovaný vzorek ke vzorkům z referenční databáze se známým fenotypem onemocnění. Při vyšetření molekulárním mikroskopem (MMDx) je vypracována souhrnná zpráva, která na základě srovnání vzorku s referenční databází a pomocí známých klasifikátorů určí pravděpodobnost TCMR (67), ABMR (68), rejekce (69), intersticiální fibrózy/tubulární atrofie (70), akutního poškození ledvin (71) a progresu do renálního selhání (72). Následná integrace molekulárně patologického vyšetření s výsledky histologie a DSA tak usnadní interpretaci výsledků.

Výhody molekulární patologie spočívají ve větší míře objektivity. Dále je možné vyšetřit i vzorek renální tkáně nedostatečný pro histologické vyšetření. Molekulární vyšetření je totiž proveditelné i z menšího množství tkáně a na rozdíl od histologie nevyžaduje přítomnost glomerulů a arterií v kůře ledviny a je možné ho provést i ze dřene (73). Kromě toho molekulární patologie umožňuje nahlédnout do patogeneze onemocnění (66) a lépe porozumět specifickým patologickým dějům v transplantované ledvině. Molekulární patologie vedla ke zjištění, že zatímco jsou oba typy rejekce (TCMR i ABMR) spojené s produkcí interferonu gamma, u TCMR dominuje intersticiální prezentace antigenů T lymfocytům a u ABMR převažují procesy zprostředkované NK-buňkami v mikrocirkulaci. Znalost těchto specifických znaků vedla k vytvoření klasifikátorů pro TCMR a ABMR. Pomocí molekulární patologie se také zjistilo, že dominantní příčinou zhoršení funkce transplantované ledviny je pozdní, nepoznaná ABMR, a ne nespecifická fibrogenese jak se předpokládalo (67, 74).

Limitace vyšetření molekulárním mikroskopem spočívají v potřebě porovnat vyšetřovaný vzorek s referenčním setem, tím je provádění vyšetření omezeno na centrální laboratoř. Navíc, molekulární změny nejsou úplně specifické a vyšetření je více než k detekci fokálních nálezů vhodné k diagnostice difúzních změn. Alternativním přístupem k vyšetření tkáně uložené ve stabilizačním roztoku by bylo provedení molekulárního vyšetření RNA extrahované z histologického vzorku fixovaného ve formalinu. Takový přístup by vyžadoval odlišnou technologii microarray a nová referenční data, jelikož analýzy tkáně stabilizované v RNA later® by nebylo vhodné pro tyto účely použít. Kombinace takového přístupu s laserovou mikrodisekcí by pak umožnila analýzu i vysoce fokálních změn (75).

Zatím je vyšetření limitováno značným poškozením tkáňové RNA laserem při mikrodisekci, vysokými náklady a technickou náročností.

V klinické praxi se využití molekulárního mikroskopu nabízí převážně u případů s nejasným histologickým závěrem nebo komplikovaným klinickým průběhem. Diskrepance mezi histologickým a molekulárním vyšetřením není zřídka a objevuje se až u 36 % vzorků (76). Např. je známo, že mnoho C4d negativních nálezů, které by konvenčním histologickým vyšetřením nebyly označeny za protilátkami-zprostředkovanou rejekci, vykazuje molekulární fenotyp ABMR (77). A naopak, u mnoha bioptických nálezů v-léze, patologiem klasifikovaných jako TCMR, nebyl nalezen molekulární korelát TCMR (78). Poznatky z těchto molekulárních studií již vedly k úpravě histologické Banffské klasifikace a mají všechny předpoklady zlepšit predikci osudu transplantované ledviny (6, 8, 71, 72). Konkrétní příklad vyšetření tkáně transplantované ledviny znázorňuje obr. 9.

Informace o pacientovi → Patient and Institution Information

Klinická interpretace → Pure Molecular Interpretation (Qualitative Summary)

Souhrn molekulárních změn (skóre rejekce, poškození) → Biopsy Scores and Injury Scores

Vizualizace vztahu bioptického vzorku k ostatním vzorkům v referenční databázi → Scatter plots (PCA)

Zobrazení konkrétní biopsie → Detailed molecular scores table

Podíl molekulárních změn asociovaných s rejekcí → Summary statistics

Přehled srovnatelných biopsií → Comparison of biopsy scores

Podrobné molekulární skóre → Detailed molecular scores

Srovnání vyšetřované biopsie s jinými relativně normálními biopsiemi → Comparison with normal biopsies

Obr. 9. Interpretace souhrnné zprávy z molekulárního vyšetření bioptované tkáně transplantované ledviny. Převzato z (79).

8. Terapeutické a preventivní možnosti u akutní rejekce

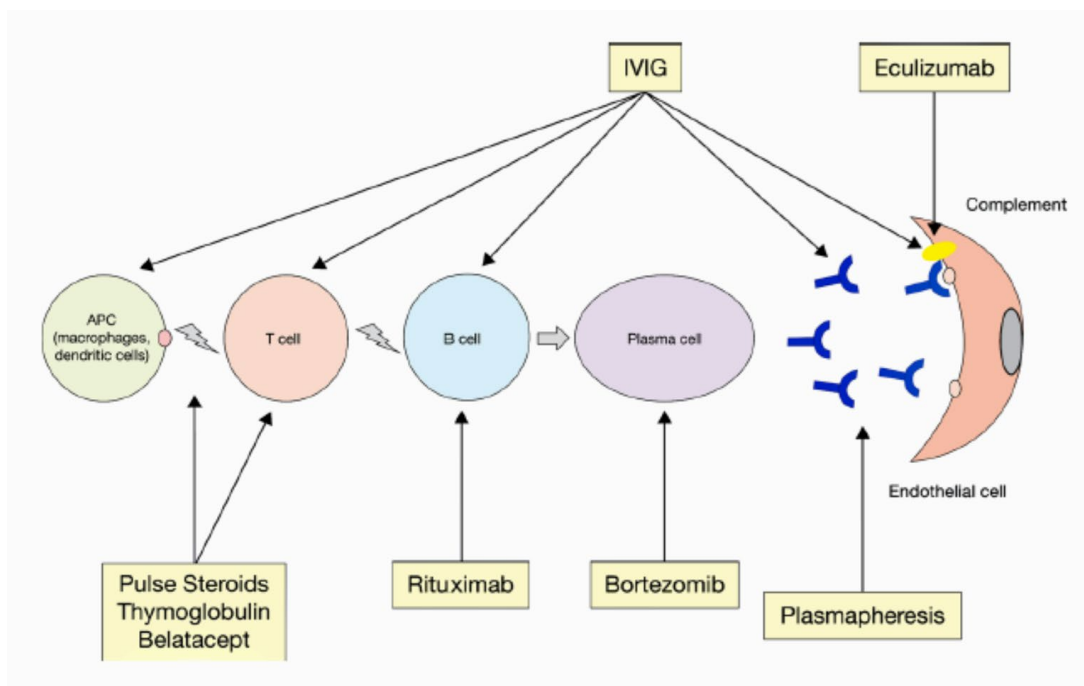
8.1 Léčba akutní T buňkami zprostředkované rejekce

Léčba akutní TCMR je založena na intravenózním podání pulzů metylprednisolonu nebo na navýšení dávky perorálních steroidů. V případě těžšího typu akutní TCMR (vaskulární rejekce, typ 2A a vyšší) nebo rejekce rezistentní ke steroidům je terapie založena na podání depleční antilymfocytární protilátky – antithymocytárního globulinu (80). Hraniční změny nejsou považovány za rejekci, ale většina kliniků je léčí podáním steroidů nebo navýšením udržovací imunosuprese (81, 82).

8.2 Léčba akutní protilátkami zprostředkované rejekce

Léčebná strategie akutní ABMR není jasně definována a může se lišit jak u jednotlivých případů, tak mezi transplantačními centry. Primárním cílem léčby ABMR je odstranění existujících protilátek a inhibice tvorby nových, které by aktivací komplementu vedly k následnému poškození tkáně transplantované ledviny (obr. 10) (28, 83-85). Nejčastěji je léčba založena na kombinaci plazmaferéz s intravenózními imunoglobuliny (IVIg) (86-88). Plazmaferéza dočasně odstraňuje protilátky z oběhu (89). Intravenózní imunoglobuliny kromě blokády funkce protilátek působí imunomodulačně na mnoha místech patofyziologického řetězce ABMR (inhibice komplementu, inhibice aktivace makrofágů, neutrofilů, apoptóza B lymfocytů) (90). Základní léčba může být doplněna intravenózním podáním kortikosteroidů, někdy dokonce podáním Thymoglobulinu – depleční polyklonální protilátky proti T lymfocytům (91).

U případů akutní ABMR refrakterní na iniciální léčbu lze podat monoklonální protilátku anti-CD20 (Rituximab), event. i v kombinaci s cykly bortezomibu a dalšími plazmaferézami (5, 92-94). Rituximab je zaměřen na nezralé B-lymfocyty, vede k jejich apoptóze a tím zabraňuje jejich proměně na plazmatické buňky produkující protilátky (95). Bortezomib je inhibitor proteasomů, který působí přímo na plazmatické buňky a snižuje tvorbu dárcovsky specifických protilátek (96). Ve výjimečných případech těžké formy ABMR lze zvážit podání eculizumabu, který blokádu C5 složky komplementu inhibuje aktivaci terminálního komplexu (97). V klinickém zkoušení je blokáda komplementu inhibítorem C-1 esterázy (98). Ve výjimečných případech velmi závažné ABMR lze zvážit provedení splenektomie (99).



Obr. 10. Léčebná strategie u akutní protilátkami zprostředkované rejekce. Převzato z (28).

Největší riziko rozvoje ABMR mají vysoce senzitivovaní příjemci po opakovaných transplantacích. Vzhledem k obtížné a nákladné léčbě s nejasným výsledkem a vysokým rizikem přechodu do chronické ABMR uplatňuje většina transplantačních center preventivní strategii založenou na důkladném určení imunologického rizika před transplantací a použití indukční, případně desenzitizační léčby v peritransplantačním období (100).

8.3 Preventivní strategie u akutní rejekce

Prevence akutní rejekce je založena na následujících principech (28):

1. omezit transplantace vysoce senzitivovaných příjemců – toto navrhované opatření je dvojsečné. Na jedné straně sice sníží výskyt ABMR, na straně druhé vede ke kumulaci vysoce senzitivovaných příjemců na dialýze a jejich zkrácenému přežívání. V našem transplantačním centru se snažíme najít cestu jak úspěšně transplantovat vysoce senzitivované příjemce pomocí níže uvedených bodů.
2. omezit podávání krevních převodů (101)
3. transplantovat vysoce senzitivovaným příjemcům ledvinu

- od žijícího HLA kompatibilního dárce v rámci párové výměny (102)
 - od kadaverózního HLA kompatibilního dárce, např. v rámci speciálního programu (Eurotransplant Acceptable Mismatch Program). V rámci tohoto programu se pro extrémně vysoce senzitivované příjemce hledá vhodný HLA kompatibilní orgán od zemřelého dárce v evropských zemích sdružených v Eurotransplantu (103).
4. precizní charakteristika protilátek u vysoce senzitivovaných příjemců a přesná HLA typizace dárce (104)
 5. desenzitizace na čekací listině nebo v peritransplantačním období
 - odstranění dárcovsky specifických protilátek (plazmaferézy, imunoabsorpce) (105)
 - přímá nebo nepřímá inhibice tvorby DSA před nebo časně po transplantaci použitím
 - monoklonální anti-B lymfocytární protilátky (Rituximab) (95, 106)
 - léčiva proti plasmatickým buňkám (proteasomové inhibitory – bortezomib) (28)
 - králičího antilymfocytárního imunoglobulinu (Thymoglobulin) (107, 108)
 - inhibice komplementové kaskády (např. eculizumab) (109)
 - intravenózní imunoglobuliny (IVIg)(110)
 - splenektomie (111)
 6. monitorace dárcovsky-specifických protilátek v potransplantačním průběhu (112)
 7. protokolární biopsie k odhalení a léčbě subklinické rejekce (113)
 8. skríníng nonadherence k užívání imunosuprese (114)

9. Zhodnocení významu vlastních výsledků

Akutní vaskulární rejekce (AVR) představuje závažný stupeň aloimunitního poškození štěpu, pro který je typická intimální arteritida (tzv. v-léze). V závislosti na stupni arteritidy (v1-v3) dochází k zúžení průsvitu cévy až fibrinoidní nekróze stěny cévy a zamezení krevního průtoku. Vzhledem k absenci kolaterálního krevního zásobení v ledvinách pak dochází k ischemii ledvinné tkáně za obstrukcí a k její následné fibrotizaci a ztrátě funkčních vlastností.

Vaskulární rejekce byla původně považována za T buňkami zprostředkovaný proces. Humorální neboli protilátkami zprostředkovaný fenotyp akutní vaskulární rejekce byl připouštěn jen u nejtěžšího stupně arteritidy (v3) a za podmínek splnění ostatních diagnostických kritérií (4). Až později byly identifikovány případy akutní vaskulární rejekce zprostředkované protilátkami bez ohledu na stupeň intimální arteritidy a s vysokým rizikem selhání štěpu (5). Nepříznivá prognóza humorálních fenotypů AVR spočívala v jejich často mylném označení za celulární proces a použití nevhodné antirejekční léčby cílené na T lymfocyty místo léčby cílené na snížení a zabránění tvorby protilátek.

Správné určení fenotypu AVR je při volbě terapeutického přístupu zásadní a představuje problém i v dnešní klinické praxi. Diagnostická kritéria byly recentně modifikována s cílem přesnější identifikace fenotypu AVR. I přes změny těchto diagnostických pravidel je v klinické praxi někdy obtížné rozlišit mezi dvěma fenotypy rejekce, celulárním a humorálním. Molekulární metody představují nástroj ke zlepšení diagnostiky patologických procesů v transplantované ledvině a jejich zavedení je přinejmenším žádoucí u složitých klinických případů po transplantaci ledviny (7). Ve srovnání s konvenční histologií má použití tzv. molekulárního mikroskopu vyšší senzitivitu a specifitu a umí lépe predikovat osud transplantované ledviny (8).

Vědecká činnost, která je podkladem této habilitační práce, je ve své první části (Novotny et al., 2018) zaměřena na studium chování akutní vaskulární rejekce v klinické praxi. Retrospektivní studie analyzovala klinický průběh jednotlivých fenotypů akutní vaskulární rejekce u pacientů po transplantaci ledviny (115). V databázi 1015 osob bylo nalezeno 101 osob s AVR, u kterých byla provedena podrobná opakovaná analýza histologického materiálu s ohledem na recentní úpravu Banffské klasifikace a bylo doplněno vyšetření dárcovsky specifických protilátek (DSA) z archivovaných vzorků sér s cílem správně identifikovat fenotyp AVR. Pacienti byli následně dle fenotypu AVR rozděleni do kategorií: izolovaná v-léze (IV, n=25), T buňkami zprostředkovaná vaskulární rejekce (TCMRV, n=18), protilátkami zprostředkovaná vaskulární rejekce (AMRV, n=19) a suspektní AMRV (sAMRV, n=36). Diagnostická kritéria zobrazuje tabulka 3.

Fenotyp	MI (g+ ptc)	i	t	v	C4d	DSA
IV	0	<2	<2	1-3	0	neg
TCMRV	0	0-3	0-3	1-3	0	neg
AMRV	0-6	0-3	0-3	1-3	0-3	pos
sAMRV [#]	0-6	0-3	0-3	1-3	0-3	neg/pos

Tabulka 3. Definice jednotlivých fenotypů AVR

[#]Pacienti s intimální arteritidou splňující 2 ze 3 kritérií protilátkami zprostředkované rejekce podle recentní Banffské klasifikace z r. 2013. (3) Zkratky: AMRV, protilátkami zprostředkovaná vaskulární rejekce; DSA, dárcovsky specifické protilátky; g, glomerulitida; i, intersticiální zánět; IV, izolovaná v-léze; MI, mikrovaskulární zánět; ptc, peritubulární kapilaritida; sAMRV, suspektní protilátkami zprostředkovaná rejekce; t, tubulitida; TCMRV, T buňkami zprostředkovaná vaskulární rejekce; v, intimální arteritida.

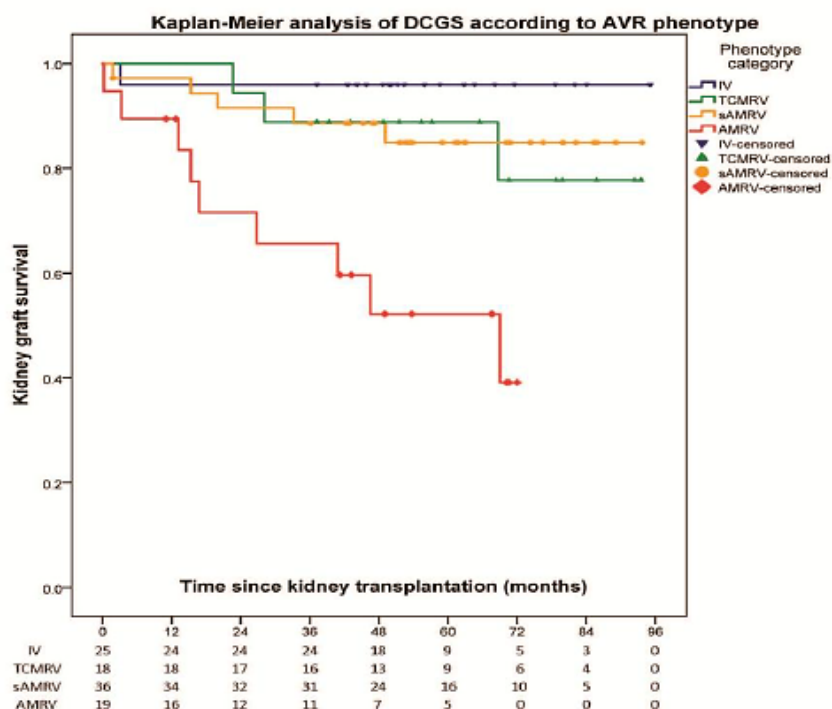
Analýza poukázala na významnou incidenci (10%) akutní vaskulární rejekce v 1. roce po transplantaci. AVR byla zachycena převážně časně po transplantaci (medián 19 dnů) a byla převážně mírného (v1, 68%) nebo středního stupně (v2, 28%).

Humorální fenotyp AVR (sAMRV, AMRV) byl ve srovnání s celulárními fenotypy častěji diagnostikován v indikační biopsii (78 %, p=0,014), vyskytoval se častěji u pacientů po retransplantaci (47 %, p=0.001), s vyšším imunologickým rizikem (medián 4 HLA neshody, p=0,052). Zatímco funkční odpověď na antirejekční léčbu (změna sérového kreatininu) se nelišila mezi skupinami (p=0,14), surveillance biopsie potvrdila častější přetrvávání rejekce u humorálního fenotypu AVR (0% IV, 31% TCMRV, 42% sAMRV, 59% AMRV, p<0,001) a tedy horší morfologickou odpověď na podanou antirejekční léčbu (Tab. 4).

	Celkem (n=71)	IV (n=17)	TCMRV (n=13)	sAMRV (n=24)	AMRV (n=17)	P
Doba provedení kontrolní biopsie po diagnóze AVR, dny, median (IQR)	74 (22-91)	76 (24-91)	79 (34-93)	80 (16-115)	67 (18-77)	0.313
Nález v kontrolní biopsii						
Normální, n (%)	42 (59,2)	15 (88,2)	9 (69,2)	12 (50)	6 (35,3)	0,015
ABMR, n (%)	21 (29,6)	0 (0)	1 (7,7)	10 (41,7)	10 (58,8)	<0,001
TCMR, n (%)	3 (4,2)	0 (0)	3 (23,1)	0 (0)	0 (0)	0,003
Intimální arteritida ^a , n (%)	6 (8,5)	0 (0)	1 (7,7)	2 (8,3)	3 (17,6)	0,329
Infekční komplikace ^b , n (%)	5 (7)	2 (11,8)	0 (0)	2 (8,3)	1 (5,9)	0,646

Tab. 4. Histologické nálezy v kontrolní biopsii u jednotlivých fenotypů AVR. Zkratky: ABMR, akutní protilátkami zprostředkovaná rejekce; AMRV, akutní protilátkami zprostředkovaná vaskulární rejekce; sAMRV, suspektní protilátkami zprostředkovaná rejekce; t, tubulitida; TCMR, T-buňkami zprostředkovaná rejekce; TCMRV, T-buňkami zprostředkovaná vaskulární rejekce.

Naopak celulární fenotyp vaskulární rejekce byl spojen se zlepšením renální funkce (79% u TCMRV, 100% u IV) a absencí rejekčního nálezu v surveillanci biopsii (69% u TCMRV, 100% u IV) (Tab. 4). Příznivý klinický průběh celulárního fenotypu potvrzuje i dobré střednědobé přežití štěpu u pacientů s TCMRV a IV. Odhadované přežití štěpů bylo dle Kaplan-Meierové analýzy signifikantně horší u pacientů s AMRV (1 rok 90%, 3 roky 66%), zatímco ostatní fenotypy AVR vykazovaly srovnatelné přežití (IV: 96 %, 96%; TCMRV: 100%, 89%; sAMRV: 97%, 88%) (párové srovnání AMRV s ostatními skupinami pomocí χ^2 testu, IV $p=0.001$, TCMRV $p=0.020$, sAMRV $p=0.003$; log rank test 0,0004)(Obr. 11).



Ob. 11. Kaplan-Meierova analýza přežití štěpů u jednotlivých fenotypů AVR cenzorována na úmrtí pacienta (log rank 0,0004).

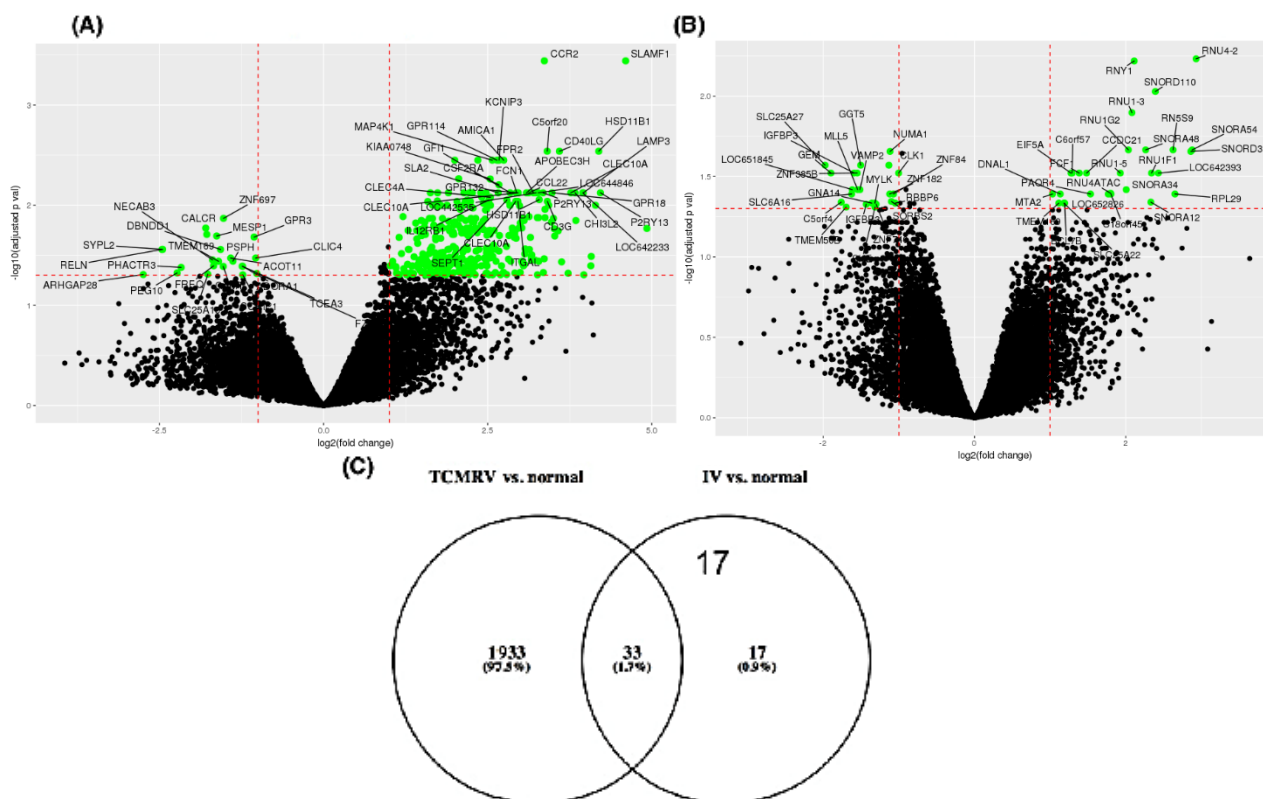
Tato studie ukazuje, že akutní vaskulární rejekce je poměrně častým nálezem v 1. roce po transplantaci ledviny. Humorální fenotyp AVR (sAMRV, AMRV) má ve srovnání s celulárním fenotypem (TCMRV, IV) závažný negativní dopad na osud transplantované ledviny. Naopak, klinický průběh izolované v-léze je velmi příznivý. Více než 1/3 IV probíhá subklinicky a je diagnostikována v protokolární biopsii 3 měsíce po transplantaci. IV odpovídá na léčbu steroidy funkčním i morfologickým zlepšením, tj. zlepšením renální funkce a vymizením rejekčního nálezu v surveillance biopsii ve 100 % případů a nevede k selhání funkce štěpu.

Druhá publikace (Wohlfahrtova et al., 2018) se věnuje využití molekulárně-patologického vyšetření jako pomocného nástroje při určení fenotypu AVR (116). V této práci jsme se zaměřili čistě na celulární fenotyp vaskulární rejekce. Pomocí metody microarray jsme analyzovali transkriptom izolované v-léze a T-buňkami zprostředkované vaskulární rejekce. Celulárnímu fenotypu je ve srovnání s humorálním přisuzován mírnější průběh a lepší prognóza štěpu. Diagnostický problém nastává v okamžiku nálezu tzv. izolované v-léze, tj. intimální arteritidy (v-léze) bez nebo s mírným tubulointersticiálním zánětem. Současná Banffská klasifikace uznává intimální arteritidu jako diagnostické kritérium TCMR bez ohledu na míru tubulointersticiálního zánětu. Patolog pak po vyloučení humorální rejekce hodnotí každou intimální arteritidu jako minimálně 2. stupeň T buňkami

zprostředkované rejekce a klinik ji léčí podáním steroidů nebo antithymfocytárního globulinu. Existují ale doklady, že izolovaná v-léze nemá rejekční původ a je spíše odrazem poškození cévního endotelu jiné etiologie, např. ischemicko-reperfúzní (77, 78, 117). Různí se taky názory na její klinický a prognostický význam a s tím spojenou volbu adekvátní terapie, a to hlavně u nálezů diagnostikovaných časně po transplantaci (118, 119). Cílem naší práce bylo blíže prozkoumat celulární fenotyp AVR a pomocí celogenomového skríníngu zjistit rozdíly v transkriptomu mezi klasickou vaskulární rejekcí s bohatým tubulointersticiálním zánětem (TCMRV) a izolovanou v-lézí (IV) s minimálním nebo žádným tubulointersticiálním zánětem. Do studijních skupin IV a TCMRV byly zařazeny pouze časně nálezy z indikačních biopsií v průběhu 1. měsíce po transplantaci po vyloučení humorálního fenotypu rejekce, tj. nálezy bez známek mikrocirkulárního poškození, positivity C4d a bez přítomnosti DSA v séru pacientů. Jako negativní kontrola sloužily normální histologické nálezy ze 3-měsíční protokolární biopsie.

Do studie bylo zahrnuto celkem 18 pacientů, tj. 6 s nálezem IV, 4 s TCMRV a 8 s normálním nálezem, u kterých byl k dispozici adekvátní vzorek bioptické tkáně vhodný k molekulární analýze. U všech skupin pacientů byl proveden celogenomový skríníng pomocí Illumina Microarrays technologie na nosiči Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip, který umožnil detekci cca 33 000 anotovaných genů. Exprimované genové produkty byly podrobeny diskriminační genové analýze a následně enrichment analýze pro detekci biologických (GO) termínů a metabolických drah odlišně exprimovaných mezi skupinami.

Analýza expresního profilu časně T-buňkami zprostředkované vaskulární rejekce a izolované v-léze identifikovala 310 rozdílně exprimovaných genů mezi TCMRV a IV. Sopeční graf (Obr. 12A) zobrazuje diferenciólně exprimované geny mezi oběma skupinami. Většina diferenciólně regulovaných genů byla zvýšeně exprimována ve skupině TCMRV (n= 288, 92.9 %).



Obr. 12. Geny s rozdílnou mRNA expresí mezi studijními skupinami. Sopeční graf zobrazuje rozdílně exprimované geny mezi TCMRV a IV (12A) a mezi IV a kontrolní skupinou (12B). Za geny s rozdílnou expresí byly považovány geny s hodnotou $P < 0.05$ po korekci na mnohočetná srovnání (Benjamin-Hochberg) a s mírou velikosti účinku (tzv. fold-change, FC) > 2 . Všechny data jsou v grafu vykreslená jako \log_2 hodnoty velikosti účinku (FC) a negativní dekadický logaritmus adjustované P hodnoty. Práh je označený přerušovanou čarou. Vennův diagram (12C) zobrazuje srovnání seznamů deregulovaných genů mezi skupinou TCMRV a kontrolní a mezi skupinou IV a kontrolní a ukazuje na malý průnik genů ($n=33$, 1.7%) mezi těmito 2 seznamy.

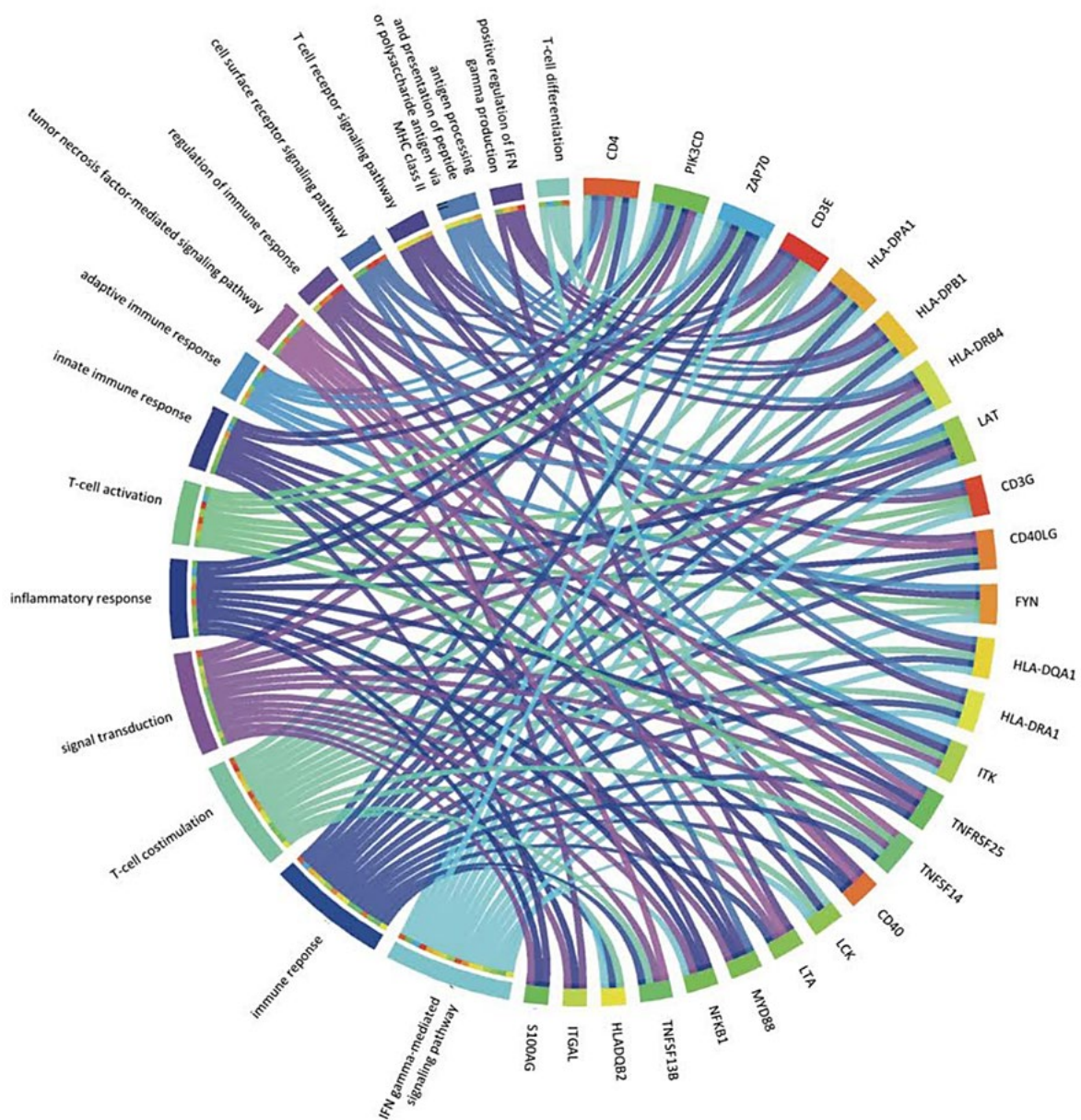
K anotaci genů diferenciálně exprimovaných mezi skupinami TCMRV a IV jsme použili databázi DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Zjistili jsme, že diferenciálně exprimované geny jsou primárně asociovány s GO termíny pro biologické procesy vnitřní a adaptivní imunity a zánětlivé odpovědi. TCMRV vzorky vykazovaly up-regulaci aktivity, kostimulace a diferenciace T lymfocytů, pozitivní regulace T lymfocytární proliferace, zpracování a prezentace antigenu a taky aktivace B lymfocytů a signálních drah receptorů pro T a B lymfocyty, interferon gamma, tumor nekrotizující faktor a jiné. 25 nejvýznamnějších GO termínů pro biologické procesy je uvedeno v tabulce č. 5.

	GO termín	Počet genů	P
GO:0006955	Imunitní odpověď	54	4.28E-31
GO:0031295	T lymfocytární kostimulace	21	7.03E-17
GO:0050853	Signální dráha receptorů pro T lymfocyty	25	8.95E-16
GO:0006954	Zánětlivá odpověď	36	9.93E-16
GO:0002250	Adaptivní imunitní odpověď	21	1.61E-11
GO:0042110	Aktivace T lymfocytů	14	2.44E-11
GO:0045087	Vrozená imunitní odpověď	31	3.24E-10
GO:0007165	Signální transdukce	50	3.01E-09
GO:0060333	Signální dráha zprostředkovaná interferonem gamma	14	4.92E-09
GO:0002504	Zpracování a prezentace antigenu přes II. třídu MHC	8	3.39E-07
GO:0050776	Regulace imunitní odpovědi	17	1.17E-06
GO:0032729	Pozitivní regulace produkce interferonu gamma	10	2.31E-06
GO:0007166	Signální dráha povrchových buněčných receptorů	20	2.84E-06
GO:0033209	Signální dráha zprostředkována tumor nekrotizujícím faktorem	13	1.77E-05
GO:0042102	Pozitivní regulace proliferace T lymfocytů	10	1.94E-05
GO:0030217	Diferenciace T lymfocytů	8	2.01E-05
GO:0006935	Chemotaxe	13	2.10E-05
GO:0006915	Apoptóza	27	2.53E-05
GO:0030168	Aktivace krevních destiček	12	7.54E-05
GO:0050853	Signální dráha pro receptory B lymfocytů	9	7.81E-05
GO:0043547	Pozitivní regulace aktivity GTPázy	26	7.88E-05
GO:0001816	Produkce cytokinů	7	8.71E-05
GO:0050900	Migrace leukocytů	12	1.18E-04
GO:0042113	Aktivace B lymfocytů	7	1.96E-04
GO:0006968	Obranná buněčná odpověď	9	2.01E-04

Tabulka 5. Nejvýznamnější biologické procesy spojené s rozdílně exprimovanými geny mezi TCMRV a

IV.

CIRCOS graf (Obr. 13) zobrazuje 15 nejvýznamnějších rozdílně exprimovaných genů mezi TCMRV a IV a jejich asociaci s biologickými procesy a metabolickými dráhami.



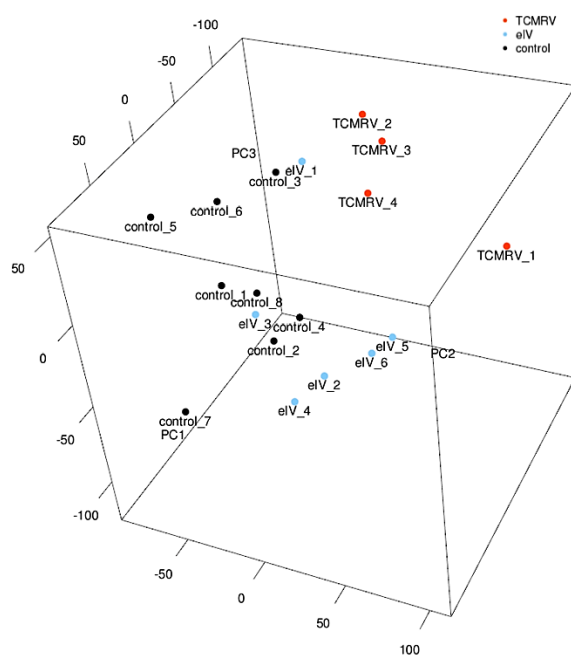
Obr. 13. CIRCOS graf – asociace 15 nejvýznamnějších diferencially exprimovaných genů mezi TCMRV a IV s biologickými procesy a metabolickými dráhami.

Výše uvedené poukazuje na signifikantně vyšší aktivaci vrozené a adaptivní imunity a zánětu v časných nálezech TCMRV ve srovnání s IV a je v souladu s teorií o zpochybňovaném rejekčním původu izolované v-léze.

Analýza expresního profilu časné izolované v-léze a normálního histologického nálezu identifikovala malou skupinu 28 genů se zvýšenou a 22 genů se sníženou mRNA expresí u IV (Obr. 12B). Naopak,

porovnání expresního profilu TCMRV s normálním histologickým nálezem ukázalo velkou skupinu signifikantně deregulovaných genů (n=1966). Diskriminační genová analýza odhalila asociaci těchto genů s 239 GO termíny pro biologické procesy, převážně spjatých s imunitní odpovědí (suppl. Tabulka 4, citace (116)) a potvrdila opravdový rejekční původ TCMRV. Vennův diagram (obr. 12C) zobrazuje porovnání rozdílně exprimovaných genů mezi studijními skupinami (TCMRV, IV) a kontrolní skupinou normálních nálezů a ukazuje na jejich malý průnik (n=33,1.7%). Sdílené geny nebyly signifikantně asociovány se žádným GO termínem. Microarray analýza odhalila, že expresní profil IV se podstatně liší od T-buňkami zprostředkované vaskulární rejekce s bohatým tubulointersticiálním zánětem (TCMRV) a je relativně podobný normálnímu histologickému nálezu.

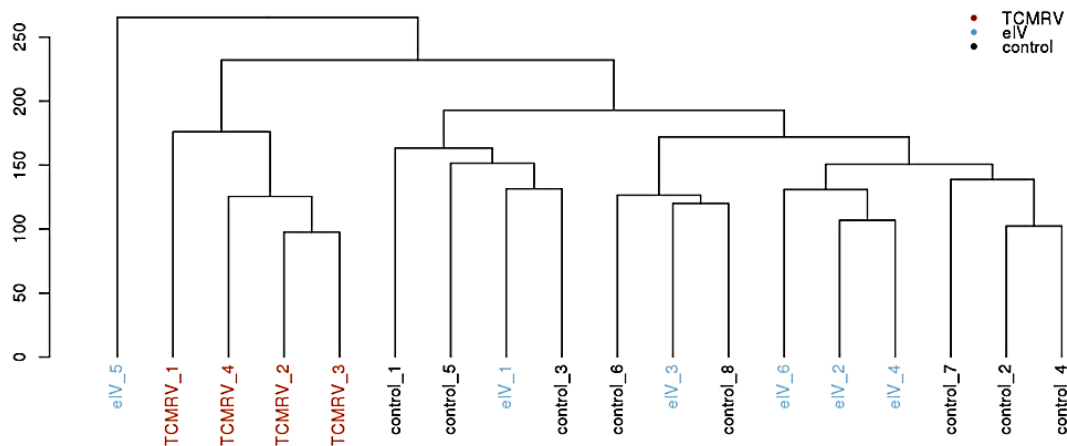
Trojrozměrná analýza hlavních komponent (PCA) aplikovaná na celý expresní profil všech zkoumaných vzorků zobrazila separaci TCMRV a IV nálezů (obr. 14) a potvrdila jejich rozdílný transkriptom. Vzorky z kontrolní skupiny vykazovaly podobný expresní profil s IV nálezy.



Obr. 14. Trojrozměrná analýza hlavních komponent (PCA) aplikovaná na celý transkriptom TCMRV, IV a normálních nálezů (microarray analýza).

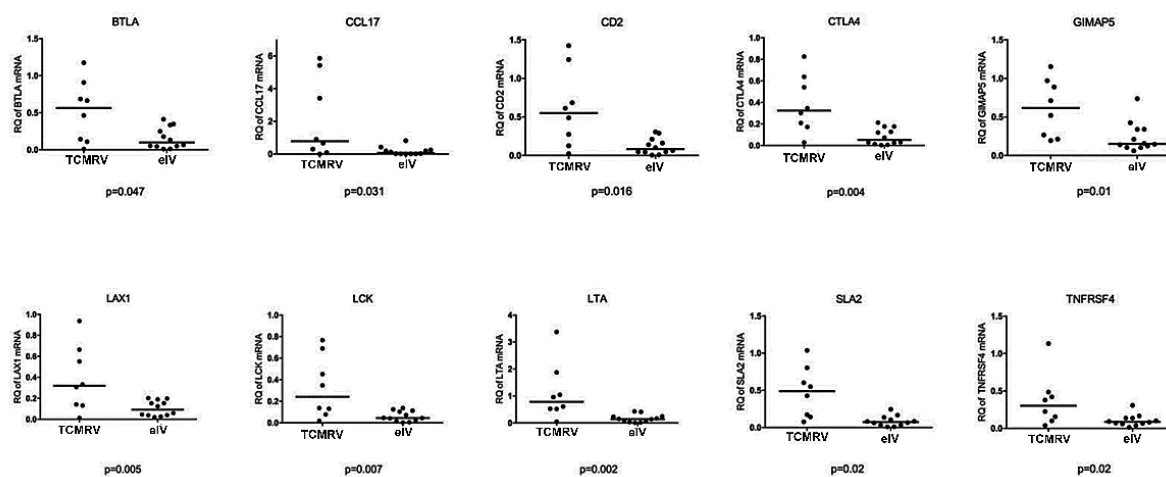
Nekontrovaná hierarchická shluková analýza (HC) bez znalosti příslušnosti vzorků ke skupině vytvořila tři hlavní shluky (obr. 15). První shluk tvořil jeden pacient (eIV5) po úspěšné léčbě IV steroidy s retrospektivně zjištěnou nízkou hladinou DSA. Druhý shluk obsahoval výhradně pacienty s TCMRV. Ve třetím shluku nebylo možné nekontrovanou HC analýzou rozlišit mezi IV a kontrolní

skupinou. Obě použité metody poukazují na rozdílnost transkriptomů TCMRV a IV a podobnost expresního profilu IV s normálním nálezem. Pokud TCMRV skutečně představuje akutní T buňkami zprostředkovanou rejekci, je izolovaná v-léze s podstatně odlišným transkriptomem pravděpodobně nerejekčního původu.



Obr. 15. Nekontrovaná hierarchická shluková analýza aplikovaná na celý transkriptom TCMRV, IV a normálních nálezů (microarray analýza).

Výsledky celogenomového skrínění byly ověřeny na validační kohortě 20 pacientů (12 IV, 8 TCMRV) pomocí metody RT-qPCR. Pro validaci jsme vybrali 38 signifikantně diferencially exprimovaných genů (adjust. $p < 0,05$, $FC > 2$) s biologickým potenciálem v patogenezi rejekce. PCR analýza potvrdila, že časné nálezy TCMRV mají signifikantně vyšší expresi genů *BCL11B*, *BTLA*, *CCL17*, *CCR7*, *CD2*, *CTLA4*, *CXCL13*, *GIMAP5*, *IL21R*, *KLRG1*, *LAX1*, *LCK*, *LTA*, *LTB*, *SLA2*, *SLAMF1*, *TNFRSF4* a *ZAP70* ve srovnání s IV (Obr. 16). Validované geny jsou dle tzv. gene enrichment analýzy spojeny s regulací imunitního systému, diferenciací, aktivací a proliferací T lymfocytů, aktivací B lymfocytů, lymfocytární a leukocytární aktivací, regulací buněčné transdukce signálu a apoptózy.



Obr. 16. Validace výsledků microarray analýzy pomocí RT-qPCR u časných nálezů izolované v-léze (IV) a T-buňkami zprostředkované rejekce (TCMRV). Bodový graf zobrazuje mRNA expresi 10 nejvíce rozdílně exprimovaných genů.

Prezentovaná práce porovnávala transkriptom časné izolované v-léze a T buňkami zprostředkované rejekce s bohatým tubulointersticiálním zánětem (TCMRV). Analýza genové exprese naznačila, že TCMRV je spojena s podstatně významnější up-regulací imunitní odpovědi než izolovaná v-léze (IV), která se spíše podobá normálnímu histologickému nálezu. Většina up-regulovaných genů ve skupině TCMRV ve srovnání s IV byla spojena s aktivací vnitřní a adaptivní imunity a zánětlivé odpovědi, tj. s aktivací, kostimulací, diferenciací a pozitivní regulací proliferace T lymfocytů, zpracováním a prezentací antigenu, s aktivací B lymfocytů a receptorů signálních drah pro T a B lymfocyty, interferon gamma, tumor nekrotizující faktor a jiné. Znalost aktivace těchto významných biologických procesů u T buňkami zprostředkované rejekce vedla v minulosti k vytvoření TCMR skóre (76, 120). Zatímco u TCMRV s bohatým tubulointersticiálním zánětem bylo TCMR skóre pozitivní až v 95% případů, většina případů IV měla TCMR skóre negativní a v nepřítomnosti DSA by proto neměla být za rejekci označována (78).

Výsledky naší práce pomáhají lépe porozumět podstatě časné izolované v-léze v nepřítomnosti dárcovské specifické protilátky a jiných morfologických znaků typických pro poškození zprostředkované protilátkami (C4d, apod.). Nález izolované intimální arteritidy (v-léze) je v tomto případě spíše odrazem peritransplantačního poškození než aloimunitního procesu (rejekce). Absence tubulointersticiálního zánětu v časných bioptických nálezech intimální arteritidy vypovídá o velmi malé pravděpodobnosti T buněčné rejekce. I když současně platná histologická Banffská klasifikace hodnotí intimální arteritidu (po vyloučení ABMR) jako nejméně 2. stupeň TCMR bez ohledu na míru tubulointersticiálního zánětu, výsledky naší práce svědčí spíše o nerejekčním charakteru a podporují

snahy o úpravy současné histologické interpretace. Je na místě zdůraznit, že zatímco charakter námi vyšetřované časné C4d negativní izolované v-léze v nepřítomnosti DSA protilátek se jeví jako nerejekční, pozdní DSA pozitivní izolovaná v-léze má často rejekční původ (78). I proto poslední setkání expertů v Banff doporučuje použití molekulárního mikroskopu u klinicky sporných fenotypů izolované v-léze (3). Výsledky naší studie podporují začlenění metod molekulární analýzy do diagnostiky izolované v-léze spolu s vyšetřením dárcovsky specifických protilátek a konvenčním histologickým vyšetřením. Tento kombinovaný přístup by mohl pomoci při přesném určení etiologie IV a volbě správného terapeutického přístupu.

Výsledky naší práce jsou v souladu s jinými microarray analýzami, které prokázaly diskrepanci mezi konvenčním histologickým a molekulárním vyšetřením u T buňkami zprostředkované rejekce. Diskrepance byla nejvíce viditelná u IV, kde většina případů vykazovala nízké TCMR skóre. Jen minimum IV mělo molekulární otisk TCMR. Intimální arteritida měla v diagnostice TCMR menší význam než tubulitida a intersticiální infiltrát (69, 76, 78, 121). Zatímco převážná část IV v 1. roce po transplantaci u pacientů bez DSA neměla rejekční původ, pozdní DSA pozitivní nálezy IV reflektovaly akutní protilátkami zprostředkovanou rejekci. V klinické praxi je mnoho v-lézí s negativním molekulárním TCMR skóre histopatologem falešně označeno za TCMR a klinikem léčeno antirejekční terapií. Naše a jiné práce naznačují, že časná IV odráží jiné než rejekční mechanismy, např. reparační odpověď na poškození způsobené implantačním stresem, endoteliální ischemicko/reperfúzní poškození (117). Přítomnost intimální arteritidy v časných nerejekčních biopsiích lze vysvětlit zvýšenou cévní permeabilitou a ulehčenou extravazací leukocytů jako následek porušení integrity endotelu renálních cév při peritransplantačním inzultu (122).

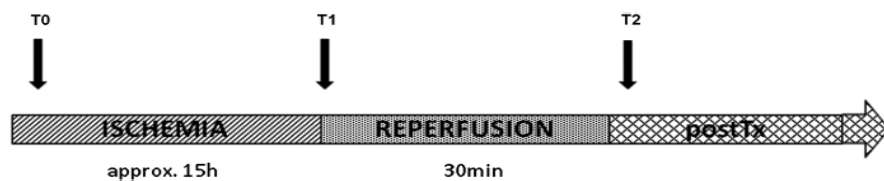
Výsledky naší práce jsou v rozporu s několika málo staršími klinickými studiemi o IV. Wu a spoluautoři označili intimální arteritidu bez ohledu na míru tubulointersticiálního poškození za akutní rejekci a za nezávislý rizikový faktor pozdního selhání funkce štěpu (123). Sis a kolektiv se domníval, že v IV představuje skutečnou akutní rejekci, protože je spojena s funkčním zlepšením po antirejekční léčbě a představuje nezávislý rizikový faktor selhání štěpu (124). Tato zdánlivá diskrepance je vysvětlitelná tím, že tyto studie analyzovaly klinické chování IV nezávisle na době po transplantaci, čímž ignorovaly fakt, že k porozumění IV je zásadní načasování biopsie. Jak se ukázalo, většina časných nálezů IV nemá molekulární otisk rejekce a je DSA negativní, zatímco pozdní IV u DSA pozitivních pacientů mají pozitivní molekulární skóre pro ABMR (78). Obě tyto studie byly založeny na klinické prezentaci intimální arteritidy a ne na analýze celého genomu a vyšetřovaly odpověď na antirejekční léčbu u heterogenní skupiny pacientů. Navíc, klinické studie, které reportovaly závažnost IV, analyzovaly biopsie z časné transplantační éry, kdy agresivní TCMR a nepoznané ABMR nebyly výjimkou. I když

byla IV historicky považována za závažnou rejekci s negativním dopadem na přežití štěpu, její charakter a význam se v posledním desetiletí změnil a měl by být přehodnocen (125). Dnes je IV jen zřídka nálezem v indikačních biopsiích. V našem centru je IV diagnostikována u 2,5% pacientů v období do 3 měsíců po transplantaci ledviny, má benigní klinický průběh a významně neovlivňuje přežití štěpů (115).

Limitací této práce je retrospektivní design a malý počet vzorků, který je v souladu s nízkou incidencí nálezu. Jsme si také vědomi faktu, že většina nálezů intimální arteritidy byla mírná až středně závažná (v1) a zachycena časně během prvního měsíce po transplantaci. Proto jsou výsledky naší práce aplikovatelné výhradně pro tuto specifickou kohortu. Dále je potřebné zdůraznit, že u všech nálezů intimální arteritidy byla podána antirejekční léčba, což mohlo ovlivnit prognózu štěpu ledviny. Nicméně, transkriptom transplantované ledviny byl analyzován před zahájením této léčby. Tato studie nepřináší návod k terapeutickému přístupu v klinické praxi. Zůstává nejasné, zda by pacienti s časnou IV měli být léčeni antirejekční medikací, navýšením stávající imunosuprese a zda-li by u nich měla být provedena kontrolní rebiopsie. Dále jsme si vědomi toho, že u některých pacientů byl nález intimální arteritidy doprovázen akutní tubulární nekrózou a mohl ovlivnit mRNA expresi i rozvoj funkce štěpu. Ve skupině s časnou IV byla navíc ve větší míře zastoupena indukční léčba basiliximabem, která mohla zmírnit histologický nález a molekulární fenotyp IV. Dále je nejasné, jestli by pro molekulární analýzu vysoce fokálních změn bylo prospěšné hodnotit expresi mRNA v renální tkáni získané laserovou mikrodisekcí. Zatím je tento přístup limitován značnou destrukcí tkáně laserem, technickou náročností a vysokými náklady (66). Navíc, molekulární patologie je oproti konvenčnímu histologickému vyšetření schopna diagnostikovat probíhající rejekci nebo renální poškození i v nepřítomnosti glomerulů a tepen, nezávisle na množství kortikální tkáně, dokonce i ze dřeně ledviny (73).

Silnou stránkou této studie je pečlivý výběr vzorků AVR. Do projektu byly zařazeny pouze nálezy intimální arteritidy s fenotypem T buňkami zprostředkované rejekce (28), diagnostikované v prvním měsíci po transplantaci, u pacientů bez anamnézy předchozí rejekce či chirurgických komplikací, se srovnatelným imunologickým rizikem a výskytem opožděného rozvoje funkce štěpu. Vyloučeny byly subklinické, pozdní a DSA pozitivní nálezy. Microarray analýza byla provedena na základě recentních doporučení (126). Jako významně deregulované geny byly hodnoceny pouze geny, které prošly korekcí pro vícenásobné testování. Analýza hlavních komponent a hierarchická shluková analýza byla založena na celých microarray datech, nejen na deregulovaných genech.

Studiu peritransplantačního inzultu, který by mohl vysvětlovat nerejekční původ izolované v-léze, se věnovala prospektivní studie (Wohlfahrtova et al., 2014), jejímž cílem bylo vyšetření molekulárního profilu ischemicko/reperfúzního poškození (I/RI)(127). I/RI představuje rizikový faktor opožděného rozvoje funkce (DGF) a negativně ovlivňuje přežití transplantované ledviny. Intrarenální transkripční profil ischemicko/reperfúzního poškození byl vyšetřen ve třech sekvenčních biopsiích štěpu ledviny - při odběru ledviny (dárcovská biopsie), v průběhu transplantace (předimplantační a poimplantační biopsie, obr. 17).



Obr. 17. Časové provedení sekvenčních biopsií v průběhu odběru orgánu k transplantaci a samotné transplantace.

I přes absenci histologických abnormalit v průběhu I/RI byla pozorována změna exprese genů ve vztahu k poškození štěpu. Ve srovnání s “molekulárním tichem ischemie” vedla reperfúze k enormním změnám transkriptomu, ke zvýšené aktivaci přirozené a adaptivní imunitní odpovědi a apoptózy a k významné heterogenitě transkripčního profilu v poimplantačních biopsiích. Naše data naznačily, že molekulární profilování přesahuje hranice histopatologie (128). Použitím “molekulárního mikroskopu” jsme byli schopni odhalit i diskrétní změny, ke kterým dochází v průběhu ischemicko/reperfúzního poškození. Dále jsme identifikovali potencionální prediktory opožděného rozvoje funkce, a to vyšší skóre pro tubulární atrofii a nízkou expresi genu pro Netrin-1. Pomocí molekulární a histologické analýzy dárcovských ledvin jsme zjistili, že nízká kvalita tubulárních buněk definována vyšší mírou tubulární atrofie v kombinaci s redukováným potenciálem protiapoptotických faktorů přežití je spojená s opožděným rozvojem funkce transplantované ledviny. Netrin-1 patří mezi tzv. faktory přežití, které protektivně působí při zotavování z I/RI (129, 130). Na rozdíl od ischemie, byla reperfúze i přes minimální výskyt histopatologických abnormalit spojena se zvýšenou aktivací přirozené a adaptivní imunity a apoptózy. Tato práce potvrdila, že kombinace konvenčních histopatologických metod s molekulární patologií by mohla představovat účinný nástroj k identifikaci dárcovských ledvin v riziku opožděného rozvoje funkce.

Ve vyšším riziku opožděného rozvoje funkce štěpu a tím i rozvoje akutní rejekce jsou ledviny od dárců s rozšířenými kritérii (ECD). Řada provedených studií se zaměřila na predikci DGF. Bylo vytvořeno

mnoho skórovacích systémů k lepší identifikaci ledvin v riziku. Nicméně, většina skórovacích systémů hodnotila pouze klinickou charakteristiku dárce a příjemce a nezahrnovala histologické hodnocení dárcovského orgánu. Právě histologický nález by mohl být užitečný při zhodnocení kvality ledvinného štěpu, k predikci výsledku transplantace a rozhodnutí o přijetí či odmítnutí ledvinného štěpu. Cílem naší další práce (Baláž et al., 2013) bylo zhodnotit vztah mezi histopatologickým skóre, klinickou charakteristikou dárce a příjemce a rizikem opožděného rozvoje funkce a identifikovat faktory, které by mohly pomoci lépe předpovědět opožděný rozvoj funkce štěpu (131). Po zhodnocení velkého množství dárcovských biopsií jsme součtem skóre pro intersticiální fibrózu (CI) a fibrózní ztlustění intimy (CV) vytvořili vlastní kompozitní tzv. CIV skóre, které nezávisle predikovalo DGF. Náš přístup založen na kombinaci CIV skóre s klinickými parametry dárce (věk + příčina úmrtí) zlepšil predikci DGF po transplantaci ledviny od tzv. marginálních dárců (ECD) a mohl by pomoci ulehčit alokaci orgánů či individualizaci imunosupresivního režimu.

Intrarenální exprese genů je značně ovlivněna i druhem imunosupresivní léčby. V naší další publikaci (Urbanova et al., 2012) jsme prokázali odlišný intrarenální transkriptom u pacientů léčených různou indukční terapií. I přes normální morfologický nález v tříměsíční protokolární biopsii a stabilní renální funkci se intrarenální transkriptom pacientů léčených Thymoglobulinem a ATG-F lišil. Indukční terapie Thymoglobulinem byla na rozdíl od ATG-F schopna u imunologicky vysoce rizikových pacientů navodit transkripční profil podobný nízkorizikovým pacientům bez indukční léčby (132). Podobnost genového expresního profilu u pacientů po indukční léčbě Thymoglobulinem s pacienty bez indukce naznačuje podobnou úroveň aktivace imunitní odpovědi ve štěpu i přes zjevné rozdíly v imunologickém riziku. Toto pozorování posiluje tvrzení předchozích studií, které ukázaly, že Thymoglobulin představuje bezpečnou a účinnou indukční léčbu k prevenci rejekce po transplantaci ledviny (133). Úspěch Thymoglobulinu v klinické praxi by mohla vysvětlovat účinnější alloimunitní regulace pomocí potlačení signální dráhy pro NF- κ B, což prokázala i tato práce (132).

Zajímavý je i rozdíl v transkriptomu v závislosti na klinickém průběhu rejekce (Wohlfahrtova et al., 2015) (134). Subklinická rejekce diagnostikována z protokolární biopsie je považována za rizikový faktor dysfunkce štěpu ledviny. Naše studie popsala transkripční profil subklinické rejekce, který vykazoval slabší aktivitu prozánětlivé odpovědi ve srovnání s „klinickou“ rejekcí doprovázenou zhoršením renální funkce či proteinurií. Pozorovaný kvantitativní rozdíl transkriptomu je v souladu s teorií, že subklinická rejekce představuje rané stadium rejekce, které pokud není léčeno, vyústí do zhoršení renální funkce. Jinými slovy, rejekce je lineární proces, kde nárůst sérového kreatininu je poslední událostí v řadě. Časná léčba subklinické rejekce je proto u většiny pacientů nezbytná k zabránění progresu intenzivní aloimunitní odpovědi a rozvoji intersticiální fibrózy.

10. Závěr

Akutní vaskulární rejekce představuje závažný stupeň aloimunitního poškození štěpu. Zatímco je její humorální fenotyp spojen s vysokým rizikem selhání štěpu, u celulárního fenotypu AVR závisí od míry tubulointersticiálního zánětu. Analýza genové exprese naznačila, že celulární, neboli T buňkami zprostředkovaná vaskulární rejekce s bohatým tubulointersticiálním zánětům (TCMRV) je spojena s podstatně významnější up-regulací imunitní odpovědi než izolovaná v-léze (IV), která se spíše podobá normálnímu histologickému nálezu. Výsledky naší práce pomáhají lépe porozumět podstatě časné izolované v-léze v nepřítomnosti dárcovsky specifických protilátek a jiných morfologických znaků typických pro poškození zprostředkované protilátkami (C4d, apod.). Nález izolované intimální arteritidy (v-léze) je v tomto případě spíše odrazem peritransplantačního poškození než aloimunitního procesu (rejekce). Absence tubulointersticiálního zánětu v časných bioptických nálezech intimální arteritidy vypovídá o velmi malé pravděpodobnosti T buněčné rejekce. Výsledky naší studie podporují začlenění metod molekulární analýzy do diagnostiky izolované v-léze spolu s vyšetřením dárcovsky specifických protilátek a konvenčním histologickým vyšetřením. Takto kombinovaný přístup by mohl pomoci při přesném určení etiologie IV a volbě správného terapeutického přístupu. Vzhledem k tomu, že současná histopatologická Banffská klasifikace považuje intimální arteritidu bez ohledu na míru tubulointersticiálního zánětu za nejméně 2. stupeň T-buňkami zprostředkované rejekce, jsou naše výsledky v souladu s požadavky na přehodnocení současného přístupu v interpretaci histologických nálezů.

11. Literatura

1. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med.* 2002;346(8):580-90.
2. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant.* 2004;4(3):378-83.
3. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant.* 2018;18(2):293-307.
4. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008;8(4):753-60.
5. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet.* 2013;381(9863):313-9.
6. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014;14(2):272-83.
7. Menon MC, Keung KL, Murphy B, O'Connell PJ. The Use of Genomics and Pathway Analysis in Our Understanding and Prediction of Clinical Renal Transplant Injury. *Transplantation.* 2016;100(7):1405-14.
8. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, Matas A, Picton M, De Freitas D, et al. Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). *Am J Transplant.* 2013;13(11):2865-74.
9. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant.* 2005;5(5):969-75.
10. Lakkis FG, Sayegh MH. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(9):2402-10.
11. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med.* 2002;8(6):582-7.
12. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331(6):365-76.
13. Simpson E, Roopenian D. Minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(5):655-61.
14. Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci.* 1999;4:D476-80.
15. Wohlfahrtova M. Transplantační imunologie. In: Molitor M, editor. *Transplantace v rekonstrukční chirurgii.* Praha: Grada; 2017. p. 17-23.
16. Beimler JH, Susal C, Zeier M. Desensitization strategies enabling successful renal transplantation in highly sensitized patients. *Clinical transplantation.* 2006;20 Suppl 17:7-12.
17. Hariharan S. Long-term kidney transplant survival. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(6 Suppl 6):S44-50.
18. Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 2005;68(1):1-13.
19. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:385-402.
20. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blancho G, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2005;353(8):770-81.
21. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2715-29.

22. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal*. 2009;7:e003.
23. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361(9):888-98.
24. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol*. 2006;7(6):652-62.
25. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med*. 2008;14(1):88-92.
26. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation*. 2002;73(9):1373-81.
27. Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(1):1-3.
28. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant*. 2014;14(2):255-71.
29. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS, et al. OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant*. 2017;17 Suppl 1:21-116.
30. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969;280(14):735-9.
31. Ogura K, Terasaki PI, Johnson C, Mendez R, Rosenthal JT, Ettenger R, et al. The significance of a positive flow cytometry crossmatch test in primary kidney transplantation. *Transplantation*. 1993;56(2):294-8.
32. Cinti P, Bachetoni A, Trovati A, Berloco P, Pretagostini R, Poli L, et al. Clinical relevance of donor-specific IgG determination by FACS analysis in renal transplantation. *Transplant Proc*. 1991;23(1 Pt 2):1297-9.
33. Tinckam K. Histocompatibility methods. *Transplant Rev (Orlando)*. 2009;23(2):80-93.
34. McCaughan JA, Tinckam KJ. Donor specific HLA antibodies & allograft injury: mechanisms, methods of detection, manifestations and management. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2018;31(10):1059-70.
35. Terasaki PI. The HLA-matching effect in different cohorts of kidney transplant recipients. *Clin Transpl*. 2000:497-514.
36. Genberg H, Kumlien G, Wennberg L, Tyden G. Isoagglutinin adsorption in ABO-incompatible transplantation. *Transfus Apher Sci*. 2010;43(2):231-5.
37. Wu WK, Famure O, Li Y, Kim SJ. Delayed graft function and the risk of acute rejection in the modern era of kidney transplantation. *Kidney Int*. 2015;88(4):851-8.
38. Haller MC, Royuela A, Nagler EV, Pascual J, Webster AC. Steroid avoidance or withdrawal for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016(8):CD005632.
39. Sawinski D, Trofe-Clark J, Leas B, Uhl S, Tuteja S, Kaczmarek JL, et al. Calcineurin Inhibitor Minimization, Conversion, Withdrawal, and Avoidance Strategies in Renal Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Transplant*. 2016;16(7):2117-38.
40. Su V, Greanya ED, Ensom MH. Impact of Mycophenolate Mofetil Dose Reduction on Allograft Outcomes in Kidney Transplant Recipients on Tacrolimus-Based Regimens: A Systematic Review. *Ann Pharmacother*. 2011;45(2):248-57.
41. Nevins TE, Nickerson PW, Dew MA. Understanding Medication Nonadherence after Kidney Transplant. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(8):2290-301.
42. Adams AB, Williams MA, Jones TR, Shirasugi N, Durham MM, Kaech SM, et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1887-95.
43. Padiyar A, Augustine JJ, Bodziak KA, Aeder M, Schulak JA, Hricik DF. Influence of African-American ethnicity on acute rejection after early steroid withdrawal in primary kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 2010;42(5):1643-7.

44. Dharnidharka VR, Fiorina P, Harmon WE. Kidney transplantation in children. *N Engl J Med.* 2014;371(6):549-58.
45. Truong LD, Barrios R, Adroque HE, Gaber LW. Acute antibody-mediated rejection of renal transplant: pathogenetic and diagnostic considerations. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(8):1200-8.
46. Cosgrove DO, Chan KE. Renal transplants: what ultrasound can and cannot do. *Ultrasound Q.* 2008;24(2):77-87; quiz 141-2.
47. Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *J Transplant.* 2012;2012:193724.
48. Salomon DR. Protocol biopsies should be part of the routine management of kidney transplant recipients. *Con. Am J Kidney Dis.* 2002;40(4):674-7.
49. Stegall MD, Cornell LD, Park WD, Smith BH, Cosio FG. Renal Allograft Histology at 10 Years After Transplantation in the Tacrolimus Era: Evidence of Pervasive Chronic Injury. *Am J Transplant.* 2018;18(1):180-8.
50. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 2012;12(2):388-99.
51. Drachenberg CB, Papadimitriou JC. Endothelial injury in renal antibody-mediated allograft rejection: a schematic view based on pathogenesis. *Transplantation.* 2013;95(9):1073-83.
52. Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2012;12(3):563-70.
53. Opelz G, Collaborative Transplant S. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet.* 2005;365(9470):1570-6.
54. Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med.* 2007;357(13):1293-300.
55. Williams WW, Taheri D, Tolckoff-Rubin N, Colvin RB. Clinical role of the renal transplant biopsy. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(2):110-21.
56. Furness PN, Taub N, Convergence of European Renal Transplant Pathology Assessment Procedures P. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project. *Kidney Int.* 2001;60(5):1998-2012.
57. Middleton D, Jones J, Lowe D. Nothing's perfect: the art of defining HLA-specific antibodies. *Transpl Immunol.* 2014;30(4):115-21.
58. Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, Jacquelinet C, Audry B, Nong T, et al. Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation. *Transplantation.* 2014;98(7):738-44.
59. Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, et al. Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. *Am J Transplant.* 2013;13(8):2075-82.
60. Gebel HM, Bray RA. In search of perfection. *Am J Transplant.* 2013;13(8):1951-2.
61. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant.* 2009;9(11):2532-41.
62. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation.* 2009;87(10):1505-13.
63. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999;286(5439):531-7.
64. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(21):2005-14.
65. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Chang J, Hidalgo LG, Beuscart T, et al. Molecular microscope strategy to improve risk stratification in early antibody-mediated kidney allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(10):2267-77.

66. Halloran PF, Famulski KS, Reeve J. Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(9):534-48.
67. Halloran PF, Chang J, Famulski K, Hidalgo LG, Salazar ID, Merino Lopez M, et al. Disappearance of T Cell-Mediated Rejection Despite Continued Antibody-Mediated Rejection in Late Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(7):1711-20.
68. Sellares J, Reeve J, Loupy A, Mengel M, Sis B, Skene A, et al. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant*. 2013;13(4):971-83.
69. Reeve J, Einecke G, Mengel M, Sis B, Kayser N, Kaplan B, et al. Diagnosing rejection in renal transplants: a comparison of molecular- and histopathology-based approaches. *Am J Transplant*. 2009;9(8):1802-10.
70. Venner JM, Famulski KS, Reeve J, Chang J, Halloran PF. Relationships among injury, fibrosis, and time in human kidney transplants. *JCI Insight*. 2016;1(1):e85323.
71. Famulski KS, de Freitas DG, Kreepala C, Chang J, Sellares J, Sis B, et al. Molecular phenotypes of acute kidney injury in kidney transplants. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(5):948-58.
72. Einecke G, Reeve J, Sis B, Mengel M, Hidalgo L, Famulski KS, et al. A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1862-72.
73. Madill-Thomsen KS, Wiggins RC, Eskandary F, Bohmig GA, Halloran PF. The Effect of Cortex/Medulla Proportions on Molecular Diagnoses in Kidney Transplant Biopsies: Rejection and Injury Can Be Assessed in Medulla. *Am J Transplant*. 2017;17(8):2117-28.
74. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant*. 2009;9(11):2520-31.
75. Hodgin JB, Borczuk AC, Nasr SH, Markowitz GS, Nair V, Martini S, et al. A molecular profile of focal segmental glomerulosclerosis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol*. 2010;177(4):1674-86.
76. Reeve J, Sellares J, Mengel M, Sis B, Skene A, Hidalgo L, et al. Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am J Transplant*. 2013;13(3):645-55.
77. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant*. 2009;9(10):2312-23.
78. Salazar ID, Merino Lopez M, Chang J, Halloran PF. Reassessing the Significance of Intimal Arteritis in Kidney Transplant Biopsy Specimens. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(12):3190-8.
79. [Available from: www.molecular-microscope.com/results-interpretation].
80. Randhawa P. T-cell-mediated rejection of the kidney in the era of donor-specific antibodies: diagnostic challenges and clinical significance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(3):325-32.
81. Hrubá P, Brabcová I, Gueler F, Krejčík Z, Stranecký V, Svobodová E, et al. Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney Int*. 2015;88(4):785-95.
82. Beimler J, Zeier M. Borderline rejection after renal transplantation--to treat or not to treat. *Clinical transplantation*. 2009;23 Suppl 21:19-25.
83. Roberts DM, Jiang SH, Chadban SJ. The treatment of acute antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients-a systematic review. *Transplantation*. 2012;94(8):775-83.
84. Fehr T, Gaspert A. Antibody-mediated kidney allograft rejection: therapeutic options and their experimental rationale. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2012;25(6):623-32.
85. Clatworthy MR. Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am J Transplant*. 2011;11(7):1359-67.
86. Bonomini V, Vangelista A, Frasca GM, Di Felice A, Liviano D'Arcangelo G. Effects of plasmapheresis in renal transplant rejection. A controlled study. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1985;31:698-703.
87. Allen NH, Dyer P, Geoghegan T, Harris K, Lee HA, Slapak M. Plasma exchange in acute renal allograft rejection. A controlled trial. *Transplantation*. 1983;35(5):425-8.

88. Vangelista A, Frasca GM, Nanni Costa A, Stefoni S, Bonomini V. Value of plasma exchange in renal transplant rejection induced by specific anti-HLA antibodies. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1982;28:599-603.
89. Xie P, Tao M, Peng K, Zhao H, Zhang K, Sheng Y, et al. Plasmapheresis Therapy in Kidney Transplant Rejection. *Blood Purif*. 2018;1-12.
90. Tedla FM, Roche-Recinos A, Brar A. Intravenous immunoglobulin in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(6):630-7.
91. Garces JC, Giusti S, Staffeld-Coit C, Bohorquez H, Cohen AJ, Loss GE. Antibody-Mediated Rejection: A Review. *Ochsner J*. 2017;17(1):46-55.
92. Kaposztas Z, Podder H, Mauyyedi S, Illoh O, Kerman R, Reyes M, et al. Impact of rituximab therapy for treatment of acute humoral rejection. *Clinical transplantation*. 2009;23(1):63-73.
93. Waiser J, Duerr M, Budde K, Rudolph B, Wu K, Bachmann F, et al. Treatment of Acute Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection With Cyclophosphamide. *Transplantation*. 2017;101(10):2545-52.
94. Eckardt KU, Kasiske BL. Kidney disease: improving global outcomes. *Nat Rev Nephrol*. 2009;5(11):650-7.
95. Barnett AN, Hadjianastassiou VG, Mamode N. Rituximab in renal transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2013;26(6):563-75.
96. Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, Amiot BP, Gloor JM, Gores GJ, et al. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant*. 2009;9(1):201-9.
97. Locke JE, Magro CM, Singer AL, Segev DL, Haas M, Hillel AT, et al. The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2009;9(1):231-5.
98. Montgomery RA, Orandi BJ, Racusen L, Jackson AM, Garonzik-Wang JM, Shah T, et al. Plasma-Derived C1 Esterase Inhibitor for Acute Antibody-Mediated Rejection Following Kidney Transplantation: Results of a Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Pilot Study. *Am J Transplant*. 2016;16(12):3468-78.
99. Orandi BJ, Zachary AA, Dagher NN, Bagnasco SM, Garonzik-Wang JM, Van Arendonk KJ, et al. Eculizumab and splenectomy as salvage therapy for severe antibody-mediated rejection after HLA-incompatible kidney transplantation. *Transplantation*. 2014;98(8):857-63.
100. Morath C, Opelz G, Zeier M, Susal C. Prevention of antibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2012;25(6):633-45.
101. Yabu JM, Anderson MW, Kim D, Bradbury BD, Lou CD, Petersen J, et al. Sensitization from transfusion in patients awaiting primary kidney transplant. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(11):2908-18.
102. Kute VB, Prasad N, Shah PR, Modi PR. Kidney exchange transplantation current status, an update and future perspectives. *World J Transplant*. 2018;8(3):52-60.
103. Claas FH, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis, II. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation*. 2004;78(2):190-3.
104. Konvalinka A, Tinckam K. Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(7):1489-502.
105. Sethi S, Choi J, Toyoda M, Vo A, Peng A, Jordan SC. Desensitization: Overcoming the Immunologic Barriers to Transplantation. *J Immunol Res*. 2017;2017:6804678.
106. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, Wang J, Reinsmoen NL, Lai CH, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med*. 2008;359(3):242-51.
107. Noel C, Abramowicz D, Durand D, Mourad G, Lang P, Kessler M, et al. Daclizumab versus antithymocyte globulin in high-immunological-risk renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(6):1385-92.

108. Thibaudin D, Alamartine E, de Filippis JP, Diab N, Laurent B, Berthoux F. Advantage of antithymocyte globulin induction in sensitized kidney recipients: a randomized prospective study comparing induction with and without antithymocyte globulin. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(3):711-5.
109. Schinstock CA, Bentall AJ, Smith BH, Cornell LD, Everly M, Gandhi MJ, et al. Long-term outcomes of eculizumab-treated positive crossmatch recipients: Allograft survival, histologic findings, and natural history of the donor-specific antibodies. *Am J Transplant.* 2018.
110. Jordan SC, Tyan D, Stablein D, McIntosh M, Rose S, Vo A, et al. Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: report of the NIH IG02 trial. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(12):3256-62.
111. Uchida J, Machida Y, Iwai T, Naganuma T, Kitamoto K, Iguchi T, et al. Desensitization protocol in highly HLA-sensitized and ABO-incompatible high titer kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42(10):3998-4002.
112. Velidedeoglu E, Cavaille-Coll MW, Bala S, Belen OA, Wang Y, Albrecht R. Summary of 2017 FDA Public Workshop: Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Transplantation.* 2018;102(6):e257-e64.
113. Parajuli S, Joachim E, Alagusundaramoorthy S, Blazel J, Aziz F, Garg N, et al. Subclinical Antibody Mediated Rejection after Kidney Transplantation: Treatment Outcomes. *Transplantation.* 2019.
114. Scheel J, Reber S, Stoessel L, Waldmann E, Jank S, Eckardt KU, et al. Patient-reported non-adherence and immunosuppressant trough levels are associated with rejection after renal transplantation. *BMC Nephrol.* 2017;18(1):107.
115. Novotny M, Hrubá P, Vichová P, Malusková J, Honsova E, Viklicky O, et al. Isolated v-lesion represents a benign phenotype of vascular rejection of the kidney allograft - a retrospective study. *Transpl Int.* 2018;31(10):1153-63.
116. Wohlfahrtová M, Hrubá P, Klema J, Novotny M, Krejčík Z, Stranecký V, et al. Early isolated V-lesion may not truly represent rejection of the kidney allograft. *Clin Sci (Lond).* 2018;132(20):2269-84.
117. Mueller TF, Einecke G, Reeve J, Sis B, Mengel M, Jhangri GS, et al. Microarray analysis of rejection in human kidney transplants using pathogenesis-based transcript sets. *Am J Transplant.* 2007;7(12):2712-22.
118. Wu KY, Budde K, Schmidt D, Neumayer HH, Rudolph B. Acute cellular rejection with isolated v-lesions is not associated with more favorable outcomes than vascular rejection with more tubulointerstitial inflammations. *Clin Transplant.* 2014;28(4):410-8.
119. Rabant M, Boullenger F, Gnemmi V, Pelle G, Glowacki F, Hertig A, et al. Isolated v-lesion in kidney transplant recipients: Characteristics, association with DSA, and histological follow-up. *Am J Transplant.* 2018;18(4):972-81.
120. Saint-Mezard P, Berthier CC, Zhang H, Hertig A, Kaiser S, Schumacher M, et al. Analysis of independent microarray datasets of renal biopsies identifies a robust transcript signature of acute allograft rejection. *Transpl Int.* 2009;22(3):293-302.
121. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, Matas A, Picton M, De Freitas D, et al. Potential impact of microarray diagnosis of T cell-mediated rejection in kidney transplants: The INTERCOM study. *Am J Transplant.* 2013;13(9):2352-63.
122. Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(6):1134-40.
123. Wu K, Budde K, Lu H, Schmidt D, Liefeldt L, Glander P, et al. The severity of acute cellular rejection defined by Banff classification is associated with kidney allograft outcomes. *Transplantation.* 2014;97(11):1146-54.
124. Sis B, Bagnasco SM, Cornell LD, Randhawa P, Haas M, Lategan B, et al. Isolated endarteritis and kidney transplant survival: a multicenter collaborative study. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(5):1216-27.

125. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*. 1995;60(3):225-32.
126. Reeve J, Halloran PF, Kaplan B. Common errors in the implementation and interpretation of microarray studies. *Transplantation*. 2015;99(3):470-5.
127. Wohlfahrtova M, Brabcova I, Zelezny F, Balaz P, Janousek L, Honsova E, et al. Tubular atrophy and low netrin-1 gene expression are associated with delayed kidney allograft function. *Transplantation*. 2014;97(2):176-83.
128. Rosen S, Stillman IE. Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(5):871-5.
129. Wang W, Reeves WB, Pays L, Mehlen P, Ramesh G. Netrin-1 overexpression protects kidney from ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis. *Am J Pathol*. 2009;175(3):1010-8.
130. Reeves WB, Kwon O, Ramesh G. Netrin-1 and kidney injury. II. Netrin-1 is an early biomarker of acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(4):F731-8.
131. Balaz P, Rokosny S, Wohlfahrtova M, Wohlfahrt P, Bartonova A, Pokorna E, et al. Identification of expanded-criteria donor kidney grafts at lower risk of delayed graft function. *Transplantation*. 2013;96(7):633-8.
132. Urbanova M, Brabcova I, Girmanova E, Zelezny F, Viklicky O. Differential regulation of the nuclear factor-kappaB pathway by rabbit antithymocyte globulins in kidney transplantation. *Transplantation*. 2012;93(6):589-96.
133. Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, Keyvanfar K, Xu X, Raghavachari N, et al. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. *Blood*. 2008;111(7):3675-83.
134. Wohlfahrtova M, Tycova I, Honsova E, Lodererova A, Viklicky O. Molecular patterns of subclinical and clinical rejection of kidney allograft: quantity matters. *Kidney Blood Press Res*. 2015;40(3):244-57.

12. Vybrané komentované publikace (v poradí, v jakém se objevují v textu):

Wohlfahrtova M, Hrubá P, Klema J, Novotný M, Krejčík Z, Stranecký V, Honsová E, Vichová P, Víklíček O. Early isolated V-lesion may not truly represent rejection of the kidney allograft. Clin Sci (Lond). 2018;132(20):2269-84. (IF 5.220)

Novotný M, Hrubá P, Vichová P, Malusková J, Honsová E, Víklíček O, **Wohlfahrtova M**. Isolated v-lesion represents a benign phenotype of vascular rejection of the kidney allograft - a retrospective study. Transpl Int. 2018;31(10):1153-63. (IF 3.196)

Wohlfahrtova M, Brabcová I, Zelezný F, Balaz P, Janoušek L, Honsová E, Lodererová A, Wohlfahrt P, Víklíček O. Tubular Atrophy and Low Netrin-1 Gene Expression Are Associated With Delayed Kidney Allograft Function. Transplantation, 2014, 27;97(2):176-83. (IF 3.828)

Balaz P, Rokosný S, **Wohlfahrtova M**, Wohlfahrt P, Bartonová A, Pokorná E, Honsová E, and Víklíček O. Identification of Expanded Criteria Donor Kidney Grafts at Lower Risk of Delayed Graft Function. Transplantation, 2013, 15;96(7):633-8. (IF 3.535)

Urbanova M, Brabcová I, Girmanová E, Zelezný F, Víklíček O. Differential regulation of the nuclear factor- κ B pathway by rabbit antithymocyte globulins in kidney transplantation. Transplantation 2012 Mar 27;93(6): 589-96. (IF 3.781)

Wohlfahrtova M, Tycová I, Honsová E, Lodererová A, Víklíček O. Molecular Patterns of Subclinical and Clinical Rejection of Kidney Allograft: Quantity Matters. Kidney Blood Press Res 2015; 40:244-257. (IF 2.908)