

SOUHRN

Východisko. TGF- β je klíčovým profibrogenním cytokinem, který je spojován s patogenezí chronické transplantační nefropatie (CTN). Ischemicko/reperfuzní poškození (I/R) a hypertenze představují významné rizikové faktory vzniku CTN. Cílem první, experimentální části bylo studium efektu imunosupresiva sirolimu (SIR) na modelu akcelerované nefropatie u hypertenzních transgenních potkanů (TGR). V druhé, klinické části bylo cílem objasnit vztah obrazu CTN v protokolárních biopsiích u pacientů po transplantaci ledviny k plazmatické hladině TGF- β 1 a fibronektinu. Současně bylo cílem sledovat změny v plazmatických hladinách TGF- β 1 a fibronektinu vzhledem k typu imunosuprese.

Metody. Experimenty jsme provedli jak na hypertenzních transgenních potkanech TGR(mREN-2)-27 tak i na normotenzních potkanech. Použili jsme model akcelerovaného I/R poškození. V klinické části jsme použili protokolární biopsii štěpu po transplantaci ledviny jako metodu vhodnou k časně detekci CTN. Biopsie byly provedeny u 105 nemocných léčených různými imunosupresivními režimy 1 rok po transplantaci ledviny.

Závěry. Na modelu akcelerované nefropatie jsme zjistili, že geneticky navozená hypertenze významně akceleruje chronické změny v renálním parenchymu po I/R poškození jedné ledviny. Léčba SIR ovlivnila pouze některé důsledky I/R poškození, statisticky významně snížila expresi TGF- β 1 v intimě cév.

Analýza protokolárních biopsií ledvin prokázala, že tkáňová exprese TGF- β 1 koreluje mnohem více s chronickou transplantační vaskulopatií než se stupněm CTN. Mezi plazmatickými hladinami TGF- β 1 a funkcí štěpu, stupněm CTN, chronické vaskulopatie ani cílovou hladinou cyklosporinu A jednoznačný vztah nalezen nebyl. Ani k plazmatickým hladinám fibronektinu nebyly nalezeny žádné korelace. Významná závislost plazmatických hladin TGF- β 1 na typu imunosuprese rovněž nebyla prokázána.

SUMMARY

Background. TGF- β is a key profibrogenic cytokine associated with chronic allograft nephropathy (CAN) pathogenesis. Renal ischemia/reperfusion (I/R) injury and hypertension represent important factors contributing to the development of CAN. The aim of the first, experimental part of the present study was to investigate the effect of immunosuppressant sirolimus in a model of accelerated renal injury in hypertensive transgenic rats (TGRs). The aim of the second, clinical part was to correlate the degree of CAN in the protocol biopsy of transplanted patients with TGF- β 1 plasma levels and plasma levels of fibronectin. Another aim was to evaluate TGF- β 1 and fibronectin plasma levels in patients treated with different immunosuppressive regimes.

Methods. Experiments were performed in hypertensive transgenic TGR(mREN-2)-27 rats and their normotensive controls. We used a model of accelerated renal I/R injury. In clinical part of the present study, protocol biopsy has been suggested to be a beneficial method for early CAN detection. Protocol core biopsy was carried out in 105 kidney transplant recipients treated with different immunosuppressive regimes 12 months after renal transplantation.

Conclusions. Hypertension induced by high levels of renin in transgenic rats aggravated the renal injury induced by I/R injury. Sirolimus treatment was shown to reduce some consequences of I/R injury. We found decreased TGF- β 1 expression within the vessel intima. The analysis of protocol biopsies of transplanted patients has shown that TGF- β 1 tissue expression is linked with chronic vasculopathy. We found no relation between plasma levels of TGF- β 1 and kidney graft function, the grade of CAN, chronic vasculopathy and trough cyclosporine A levels. There were no correlations to fibronectin plasma levels. Despite the trend we have not found any association of the TGF- β 1 plasma levels with the type of immunosuppressive regime.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především svým školitelům doc. MUDr. I. Matlovi, CSc., doc. MUDr. O. Viklickému, CSc., doc. MUDr. I. Střížovi, CSc. a také všem, kteří se podíleli na publikacích uvedených v této dizertační práci.

Za pomoc při práci v laboratoři vděčím RNDr. M. Jarešové a RNDr. L. Korčákové, CSc. z Imunologického pracoviště IKEM a dále všem spolupracovníkům z Pracoviště experimentální medicíny IKEM.

Mezi ty, kteří dále ovlivnili můj zájem o imunologii patří i prof. Ilias Doxiadis (Leiden University Medical Center, Leiden, Nizozemí), na jehož oddělení jsem měla možnost pracovat.

Na tomto místě musím též poděkovat své rodině a partnerovi za pochopení a toleranci.

OBSAH

Souhrn / Summary	2
Poděkování	4
Obsah	5
Seznam grafických příloh	6
Seznam zkratk	7
1. Úvod	9
1.1 Struktura ledviny	9
1.2 Biologie TGF- β a jeho stanovení	12
1.2.1 Biologie TGF- β	12
1.2.2 Metodika stanovení plazmatické hladiny TGF- β 1, technika ELISA	17
1.3 Fibronektin	18
1.4 Nástroje ke studiu role TGF- β v experimentální transplantologii a v klinice, imunosuprese	19
1.4.1 Experimentální modely	19
1.4.1.1 Ischemicko/reperfuzní poškození (I/R)	19
1.4.1.2 Hypertenze a renin – angiotenzinový systém	22
1.4.1.3 Chronická rejekce	24
1.4.2 Protokolární biopsie štěpu u pacientů po transplantaci ledviny jako nástroj ke studiu role TGF- β v klinické transplantologii	27
1.4.3 Imunosupresivní terapie	29
1.4.3.1 Imunosupresiva	29
1.4.3.2 Rozdělení imunosupresiv	32
1.4.3.2.1 Farmaka	33
1.4.3.2.2 Protilátky	40
2. Cíl práce	44
3. Výsledky a diskuze	45
3.1 Experimentální část	45
3.2 Klinická část	49
3.2.1 Naše první zkušenosti s protokolární biopsií transplantovaných ledvin	49
3.2.1.1 Soubor nemocných a použité metody	49
3.2.1.2 Klinická a laboratorní data	49
3.2.2 Plazmatické hladiny TGF- β 1, exprese TGF- β 1 ve štěpu a chronická transplantační nefropatie v protokolárních biopsiích ledvin	51
3.2.3 Plazmatické hladiny fibronektinu u pacientů 1 rok po transplantaci ledviny	52
3.2.4 Efekt různých imunosupresivních režimů na plazmatickou hladinu TGF- β 1 a expresi TGF- β 1 u pacientů po transplantaci ledvin	54
3.2.5 Imunosuprese zvyšuje plazmatické hladiny TGF- β 1 u příjemců ledvin	55
3.2.6 Diskuze ke stanovení a hodnocení plazmatické hladiny TGF- β 1	58
4. Závěry	63
4.1 Experimentální část	63
4.2 Klinická část	63
5. Seznam vlastní literatury autora	65
6. Literatura	68
7. Soubor příloh	79

SEZNAM GRAFICKÝCH PŘÍLOH

Obr. č.1	Struktura glomerulů a tubulů	9
Obr. č.2	Detailní schema glomerulu a struktura glomerulární bazální membrány	10
Obr. č.3	Signalizační kaskáda TGF- β	15
Obr. č.4	Rozvoj chronické dysfunkce alotransplantátu (rejekce)	26
Obr. č.5	Mechanismus působení imunosupresiv-signalizační kaskáda	31
Obr. č.6	Mechanismus působení sirolimu	37
Tab. č.1	Demografická data	50
Graf č.1	Vztah plazmatických koncentrací TGF- β 1 a exprese TGF- β 1 ve štěpu	52
Graf č.2	Plazmatické hladiny TGF- β 1 u pacientů po transplantaci ledviny (TX), pacientů s chronickou renální insuficiencí (CHRI) a u kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků (K)	57
Graf č.3	Plazmatické hladiny TGF- β 1 u pacientů s různými imunosupresivními režimy	57

SEZNAM ZKRATEK

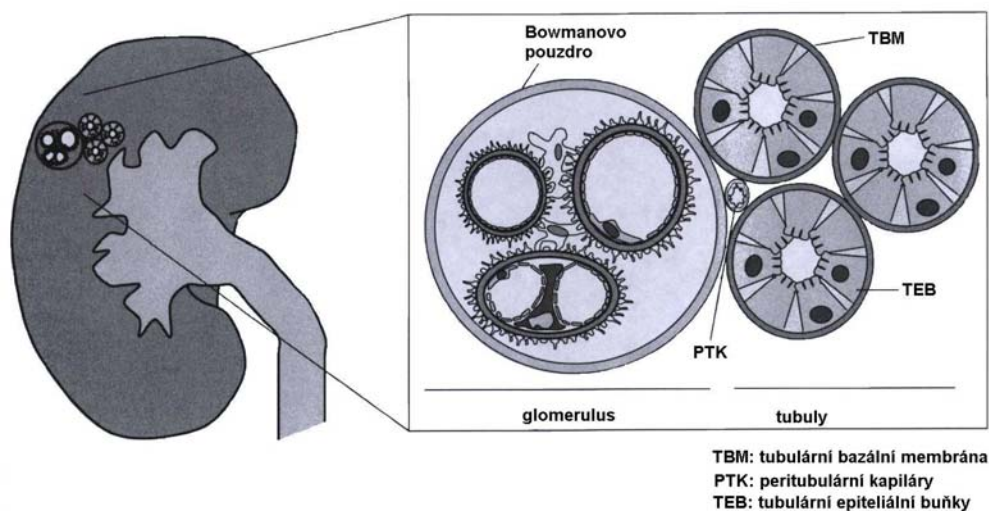
βTG	β-tromboglobulin
ACE	angiotenzin konvertující enzym
ACE inhibitor	inhibitor angiotenzin konvertujícího enzymu
ALG	antilymfocytární globulin
ALK	activin receptor-like kinase
AR	akutní rejekce
AT ₁	receptor pro angiotenzin II
ATG	antithymocytární globulin
ATN	akutní tubulární nekróza
bFGF	basic fibroblast growth factor (bazický fibroblastový růstový faktor)
BMI	body mass index
BMP	kostní morfogenetické proteiny
C	složka komplementu
CAN	chronic allograft nephropathy
CD	cluster of differentiation
CHRI	chronická renální insuficience
CNS	centrální nervová soustava
Cl-kr	glomerulární filtrace vypočtená z clearance kreatininu
CN	kalcineurin
Co-Smad	společný mediátor signální dráhy TGF-β
CR	chronická rejekce
Cs-A	cyklosporin A
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte associated protein-4 (CD 152)
CTN	chronická transplantační nefropatie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	extracelulární
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EGF	epidermal growth factor (epidermální růstový faktor)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (enzymatická imunoesej)
FKBP12	cytoplazmatický protein (imunofilín), FK binding protein 12
FK 506	imunopresivum tacrolimus
GBM	glomerulární bazální membrána
GS oblast	doména v receptoru typu I pro TGF-β1 charakterizovaná sekvencí TTSGSGSG
Han SD	Hanover Sprague-Dawley
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonová kyselina
HGF	hepatocyte growth factor (hepatocytární růstový faktor)
HLA	human leukocyte antigens
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN-γ	interferon-γ
Ig	imunoglobulin
IGF-1	inzulin-like growth factor (inzulinu podobný růstový faktor-1)
IL	interleukin
I/R	ischemie/reperfuze
K	kontrolní skupina pacientů (použito v grafu)
LAP	latency-associated peptid
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LTBP	latent TGFβ-binding protein

MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1 (monocytový chemotaktický protein-1)
MHC	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
MIP	macrophage inflammatory protein
MMF	mykofenolát mofetil
mRNA	„messenger“ ribonukleová kyselina
NK buňka	natural killer (přirození zabíječi)
OKT3	monoklonální protilátka Orthoclone (anti CD3)
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu typ 1
PDGF	platelet-derived growth factor (růstový faktor odvozený od destiček)
PRA	protilátky proti panelu
PU	proteinurie (ztráty bílkovin močí/24hod)
RAD	rapamycinový analog
RAFT1/FRAP	rapamycin and FKBP target, FKBP and rapamycin associated protein
RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
RAS	renin-angiotenzinový systém
Ren	renin
R-Smad	receptory regulované proteiny Smad
SIR	sirolimus
Smad	protein signální dráhy TGF- β
S-kr	sérový kreatinin
T β R-I	receptor typu I pro TGF- β 1
T β R-II	receptor typu II pro TGF- β 1
TAC	tacrolimus
TCR	receptor pro antigen na lymfocytech T
Tkd	krevní tlak diastolický
Tks	krevní tlak systolický
TNF- α	tumor necrosis factor- α (tumor nekrotizující faktor- α)
TGF- β	transforming growth factor- β (transformující růstový faktor- β)
TGF- β 1, β 2, β 3	izomerní formy TGF- β
TGR	transgenic rat (transgenní potkan)
TOR	target of rapamycine
TSP-1	trombospondin 1
TX	transplantace (použito v grafu)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLA	very late antigen

1. ÚVOD

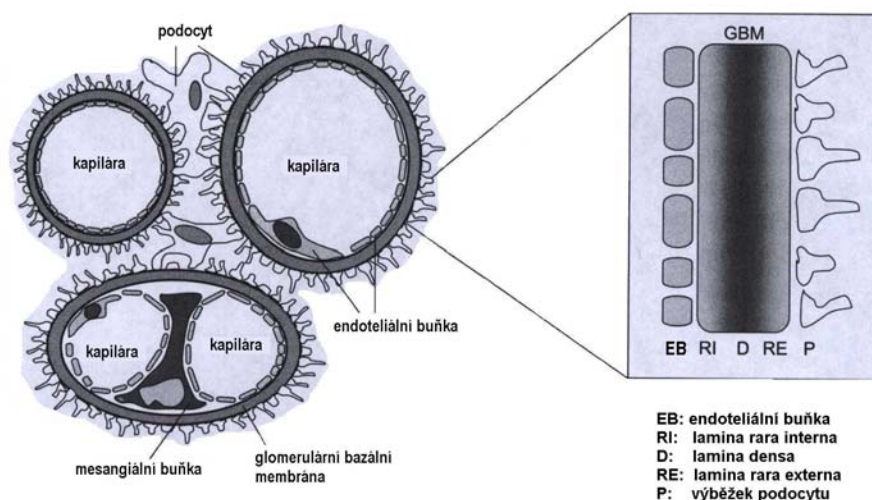
1.1 LEDVINY A NÁHRADA JEJICH FUNKCE

Ledviny jsou důležitým orgánem pro udržování homeostázy. Jejich hlavní funkcí je vylučování produktů metabolismu, toxických látek a podílejí se na regulaci tělesných tekutin. Nejmenší funkční jednotkou ledvin je nefron skládající se z glomerulů a tubulů (obr. č.1). Glomeruly jsou filtračními jednotkami. Krev je zde filtrována skrze stěnu kapilár. Mezangiální buňky a podocyty se podílejí na zajištění struktury glomerulu (obr. č. 2). Glomerulární bazální membrána (GBM) je důležitá pro udržování glomerulární selektivní permeability, která je určujícím faktorem pro propustnost částic jak z hlediska velikosti tak náboje. Na této membráně vzniká z krevní plazmy pod filtračním tlakem glomerulární filtrát. Proto má glomerulární filtrát stejné fyzikální vlastnosti a chemické složení jako krevní plazma s jediným rozdílem, absencí bílkovin. Po filtraci glomerulem jsou nezbytné molekuly a voda resorbovány zpět v tubulech, ostatní jsou vylučovány v procesu, který vede k tvorbě moče.¹



Obr. č. 1 Struktura glomerulů a tubulů.

Kůra ledvin se skládá z glomerulů, které jsou filtračními jednotkami ledvin a tubulů, které exkretují a resorbují specifické molekuly.



Obr. č. 2 Detailní schema glomerulu a struktura glomerulární bazální membrány (GBM).

Stěna kapilár je součástí filtrační membrány glomerulu. Filtrační membránu tvoří především fenestrováný kapilární endotel obklopený glomerulární bazální membránou (GBM). Mezangiální buňky a podocyty se podílejí na zajištění struktury glomerulu.

Nejrůznější onemocnění imunitní i neimunitní povahy mohou vést ke ztrátě funkce ledvin. Jakékoliv zhoršení funkce ledvin je rozhodujícím faktorem z hlediska přežití. Náhrada ledvinné funkce zahrnuje buď dialýzu nebo transplantaci ledviny. Transplantace ledviny je v současné době nejlepším způsobem náhrady funkce ledvin nemocných s terminálním renálním selháním. U všech nemocných v konečném stadiu selhání ledvin by se měla uvážit možnost transplantace ledviny. (Absolutní kontraindikací je pouze jiné progredující, život ohrožující onemocnění.) To, co bylo kdysi experimentem a postupem nutným pro záchranu života, se tak nyní stalo standardním terapeutickým postupem. Kvalita života i úprava klinického stavu je po úspěšné transplantaci obvykle daleko dokonalejší než při chronickém dialyzačním léčení.

První úspěšná transplantace lidské ledviny byla provedena Dr. J. Murrayem v roce 1954, dárce byl bratr pacienta-jednovaječné dvojče. U prvních pacientů po transplantaci nebyla použita kromě kortikosteroidů žádná imunosuprese, nic nebylo známo o rejekcích a ledviny se proto v krátké době odhojily.

Základním problémem transplantace je imunitní reakce příjemce na transplantovanou ledvinu. Protože navození imunologické tolerance je přes veškeré pokroky stále nedosaženým cílem, zůstává imunosuprese základním tématem úspěšné transplantace ledviny. Současné standardně používané imunosupresivní režimy zajišťují u imunologicky nekomplikovaného příjemce velmi dobrou kontrolu akutních rejekcí. Jednoroční přežívání nemocných po transplantaci ledviny od živého příbuzného dárce je nad 95% a funkce štěpu nad 90%. V dalším průběhu dochází asi k 3-5% ztrátě štěpu ročně, a to včetně ztráty způsobené úmrtím nemocného. Procento jednoročního přežívání pacientů po přenosu kadaverózního štěpu činí asi 90% a přežívání štěpu kolísá v různých centrech mezi 70-90%. V dalším průběhu je ztraceno 5-8% transplantovaných ledvin ročně.²

Funkce a životnost transplantovaných orgánů není neomezená. Životnost štěpu je limitována nejrůznějšími faktory, které jsou dány vlastnostmi orgánu, reakcí ze strany příjemce i samotným průběhem transplantace. Řadíme sem: pre-existující poškození štěpu, ischemicko/reperfuzní poškození, vliv imunosupresivní terapie a rejekční epizody (zhoršení funkce na podkladě imunologické odhojovací reakce). Kromě toho se dárce a příjemce liší různým stupněm genetické odlišnosti. Přestože je snaha o maximální možnou shodu v HLA genech (human leukocyte antigens), svou roli jistě hrají i polymorfismy/varianty v dalších (minoritních) antigenech. Všechny tyto faktory přispívají k poškození štěpu v procesu chronické transplantační nefropatie většinou nazývané jako chronická rejekce.

Chronická rejekce je vedle úmrtí příjemce nejčastější příčinou ztráty funkce transplantované ledviny v dlouhodobém průběhu a představuje tak vážný klinický problém současné transplantační medicíny. Velkou roli v patogenezi chronické rejekce hrají především fibrotické procesy. Zástupcem cytokinů, který se na procesu fibrotizace výrazně podílí, je TGF- β . Transformující růstový faktor β (TGF- β) je multifunkční cytokin hrající důležitou úlohu v homeostáze tkání. Uplatňuje se v četných biologických situacích provázejících zejména různá chronická onemocnění včetně chronické rejekce orgánových transplantátů. Rozvoj tkáňové fibrózy je biologický děj, který je řízen cytokiny, z nichž klíčovou roli hraje právě TGF- β . Pod jeho vlivem dochází k ukládání komponent extracelulární matrix v intersticiu.³

1.2 BIOLOGIE TGF- β A JEHO STANOVENÍ

1.2.1 Biologie TGF- β

Transformující růstový faktor β (TGF- β) je členem rodiny růstových a diferenciacních faktorů, které regulují řadu biologických procesů, například buněčný růst a diferenciaci, indukují tvorbu extracelulární matrix a apoptózu. U člověka bylo dodnes popsáno přes 50 cytokinů rodiny TGF- β . Vedle izoform TGF- β jsou dalšími ligandami z této rodiny aktiviny, inhibiny, kostní morfogenetické proteiny (BMP), růstové a diferenciacní faktory, konečně i Müllerův inhibiční faktor, často označovaný jako anti-Müllerův hormon.⁴ Společným rysem aktivních cytokinů rodiny TGF- β je forma dimeru, obdobně jako je tomu u níže popsaných receptorů typu I a II pro tyto cytokiny.

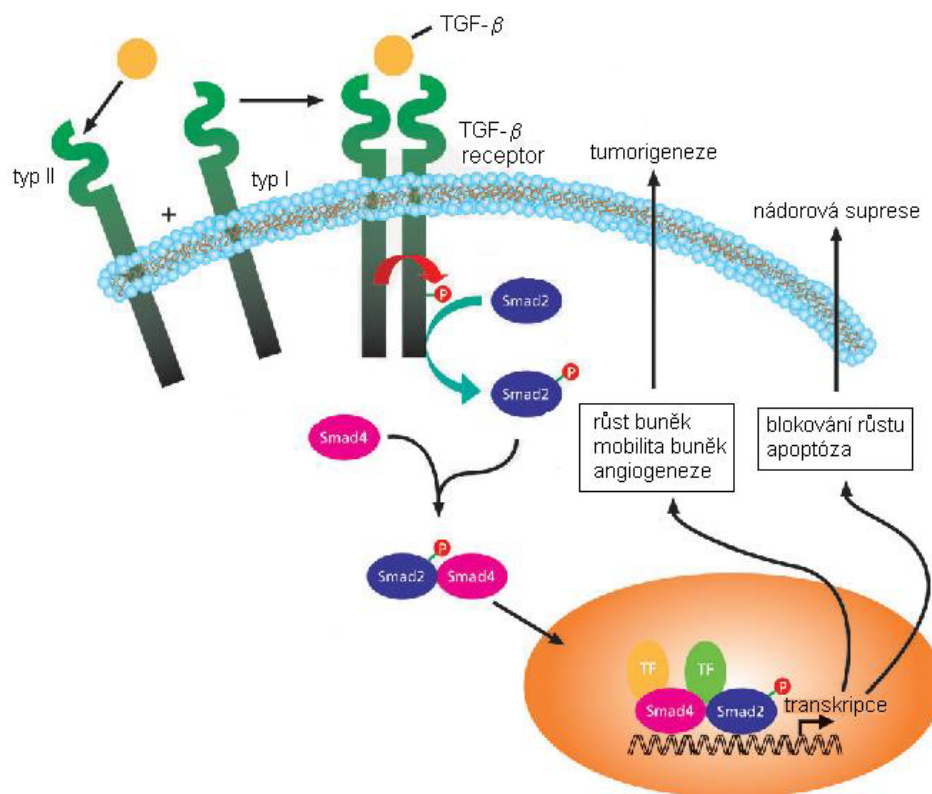
TGF- β existuje v pěti izomerních formách, z toho u savců se vyskytují tři izomerní formy TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3). Je syntetizován mnoha typy buněk, jako jsou destičky, makrofágy, lymfocyty, ale i buňkami orgánů např. ledvin. Nejvíce zastoupenou izoformou u většiny buněk a tkání je TGF- β 1. Izoformy TGF- β mají asi 70% vzájemnou homologii a váží se ke stejným receptorům, což dokazuje jejich konzervativní strukturu.⁵

Všechny jsou syntetizovány jako prekursory a sekretovány ve formě latentního komplexu (110 kDa). Latentní forma se skládá z homodimeru polypeptidu TGF- β (25 kDa), který je nekovalentně svázán do komplexu s glykoproteinem LAP (latency-associated peptid). Tento komplex je neaktivní a není rozeznáván betaglykanem ani dalšími receptory.⁶ Ve většině buněk je LAP ještě kovalentně vázán s dalším glykoproteinem LTBP (latent TGF β -binding protein). LTBP je důležitý k účinné sekreci a správnému skladování TGF- β v extracelulární matrix, k jeho latenci vztah nemá. Ta závisí na přítomnosti LAP. Uvolnění biologicky aktivního dimeru TGF- β ze sekretované latentní formy TGF- β předchází vazbě na povrchové buněčné receptory. K aktivaci TGF- β musí být LAP z komplexu proteolyticky odštěpen⁶. Fyziologická aktivace latentního TGF- β je komplikovaný a zatím jen částečně prozkoumaný proces. Faktory ovlivňující uvolnění TGF- β z komplexu mohou být změny pH, změny iontové síly nebo účast proteinu trombospondinu 1 (TSP-1). TSP-1 je velký homotrimerní protein sekretovaný mnoha typy buněk, který aktivuje TGF- β 1 v pokusech *in vitro* a částečně i *in vivo*. Dvě serinové proteázy, plasmin a kathepsin D a adhezivní molekula ze skupiny integrinů $\alpha\beta$ 6 také aktivují latentní TGF- β . Naopak již aktivovaný TGF- β může být inhibován lokálními faktory (decorin), které mohou TGF- β vázat.⁶

Po uvolnění se TGF- β váže na receptor RII na povrchu cílové buňky. Receptory pro přenos signálu cytokinů rodiny TGF- β jsou transmembránové glykoproteiny na povrchu buněk. Jedná se o kinázy fosforylující serin a treonin. Receptory typu II fosforylují receptory typu I v GS oblasti (doména obsahující sekvenci TTSGSGSG) po aktivaci ligandou, která indukuje tvorbu heteromerního komplexu receptoru typu I a II. Přísun ligandy k receptorům je řízen několika proteiny (betaglykan, endoglin), které jsou také označovány jako typ III receptoru pro TGF- β . Betaglykan je v membráně zakotvený proteoglykan, který zvyšuje lokální koncentraci ligandy, a tím její vazbu k receptorům. Toto má význam především pro TGF- β 2, který má nízkou afinitu vazby k receptorům na rozdíl od TGF- β 1 a TGF- β 3. Transmembránový protein endoglin je exprimován převážně na buňkách endotelu a váže TGF- β 1 a TGF- β 3, neváže TGF- β 2.⁶

Při signalizaci TGF- β je nutná spolupráce receptorů. Bylo pozorováno, že receptor typu I není schopen vázat ligandu v nepřítomnosti receptoru typu II, a typ II, který je schopen sám vázat ligandu nemůže signalizovat bez typu I. Interakce receptorů vede k fosforylaci receptoru typu I. Byly popsány negativní regulátory receptoru v přenosu signálu. Jedná se například o cytoplazmatický protein (imunofilín) FKBP12, který slouží jako receptor pro imunosupresiva FK506 a rapamycin. V nepřítomnosti ligandy se FKBP12 váže na GS doménu v receptoru typu I (T β R-I), a tím blokuje fosforylaci aktivačních míst pomocí receptoru typu II (T β R-II). Komplex receptor-liganda a transfosforylace pomocí T β R-II vede k uvolnění FKBP12 z T β R-I s možností aktivace receptoru.⁶

Fosforylací aktivované receptory typu I (dříve označované ALK, „activin receptor-like kinase“) fosforylují proteiny Smad řízené receptory (R-Smad). R-Smad 2 a 3 přenášejí signál od TGF- β a váží společný mediátor (Co-Smad), kterým je protein Smad 4. Fosforylované R-Smad tvoří heteromerní komplex s Co-Smad. Vzniklý komplex se přemístí do jádra a zde reguluje transkripci cílových genů po přímé vazbě k DNA nebo po interakci s jinými proteiny vázajícími se k DNA, transkripčními faktory, koaktivátory nebo korepresory transkripce.⁷ Smad tak představují celou skupinu molekul podílejících se na nitrobuněčném přenosu signálu z receptoru přímo do buněčného jádra, kde pak stimulují expresi genů odpovědných za příslušnou funkci, kterou může být jak stimulace, tak i inhibice růstu⁷ (obr. č. 3).



Obr.č. 3 Signalizační kaskáda TGF- β .

TGF- β tak ovlivňuje proliferaci a diferenciaci různých typů buněk v těle a může tedy sloužit jako růstový aktivátor i růstový inhibitor. S tím souvisí i jeho profibrogenní účinek, který je zajišťován následujícími mechanismy: stimulací syntézy většiny molekul, které vytvářejí extracelulární matrix (fibronectin, kolagen, proteoglykany), blokadou degradace matrix (moduluje expresi tkáňových metaloproteináz a tkáňových inhibitorů proteolytických enzymů), expresí integrinových molekul a tím regulací adheze buněk a autoindukcí vlastní produkce TGF- β . Výsledkem těchto mechanismů je pak depozice extracelulární matrix.³ TGF- β působí jako chemoatraktant pro fibroblasty a stimuluje rovněž replikaci nezralých fibroblastů. Má tedy úlohu v patogenezi nadprodukce vaziva, působí proskleroticky. Výše uvedenými mechanismy významně reguluje obnovu poškozených tkání a zároveň hraje důležitou roli v procesu fibrogenese, tj. mechanismu, který se uplatňuje v patogenezi chronické rejekční nefropatie u orgánových transplantací a který vede ke zkrácení životnosti štěpu^{5,8}. V imunitním systému má TGF- β roli především imunosupresivní. Inhibuje proliferaci T i B lymfocytů i NK buněk, vývoj cytotoxických makrofágů, potlačuje produkci imunoglobulinů a moduluje produkci některých cytokinů. Tím, že působí jako chemoatraktant pro makrofágy a neutrofilů, má i účinek prozánětlivý⁹. Patogenetická role TGF- β v imunologické aktivaci a procesu jizvení transplantované ledviny je tedy vysoce pravděpodobná. Bylo prokázáno, že vedle dalších faktorů vede ke zvýšené produkci TGF- β také ischemie¹⁰.

1.2.2 Metodika stanovení plazmatické hladiny TGF- β 1, technika ELISA

Ke stanovení plazmatické hladiny TGF- β 1 byla použita následující metodika. Periferní žilní krev byla od pacientů odebírána standardní metodou do zkumavek s antikoagulační látkou EDTA a následně centrifugována 4000g/5 minut. Izolovaná plazma byla skladována při -20°C do doby provedení vlastní eseje. Plazmatické hladiny TGF- β 1 byly stanovovány pomocí enzymoimunochemické metody ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Vzorky musely být nejprve acidifikovány, aby došlo k aktivaci přítomného TGF- β 1 (původně v inaktivní formě s nutností konformace proteinu-odštěpení LAP „latency associated peptid“). Toto bylo provedeno přidáním 0,1 ml 2,5 N kyseliny octové s 10 M ureou k 0,1 ml vzorku. Po důkladném promíchání a 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě byly vzorky neutralizovány pomocí 2,7 N NaOH s 1 M HEPES (pH 7,2-7,6). Vzorky tak byly připraveny ke stanovení celkového TGF- β 1 (aktivní + latentní formy). Do 15 minut následovala vlastní esej založená na principu „sandwichové“ techniky ELISA. K měření TGF- β 1 byla použita firemní souprava pro kvantitativní stanovení koncentrací aktivovaného lidského TGF- β 1 od firmy R&D Systems, Abingdon, United Kingdom.

U této techniky je použita plastová destička, která je potažena TGF- β 1 rozpustným receptorem typu II, který váže imunoreaktivní TGF- β 1 (tj. TGF- β 1 po aktivaci). Do jamek na destičce se pipetuje 200 μ l standardů a aktivovaných vzorků a jestliže je přítomen TGF- β 1, tento se naváže na receptor v průběhu 3 hodinové inkubace. Po trojnásobném promytí se přidá do každé jamky 200 μ l enzymaticky značené polyklonální protilátky specifické pro TGF- β 1 (konjugát), která se během 1,5 hodinové inkubace naváže na TGF- β 1, které se navázalo v průběhu první inkubace.

Následuje opět trojnásobné promytí jamek, poté se do každé jamky přidá 200 μ l substrátu. Během 20 minutové inkubace se objeví zbarvení úměrné množství TGF- β 1 navázaného na začátku. Reakce se zastaví přidáním 50 μ l stop solution do každé jamky a do 30 minut se změří barevná intenzita. Standardní křivka pro TGF- β 1 byla vytvořena pomocí standardů rekombinantního lidského TGF- β 1 proteinu 2000, 1000, 500, 250, 62,5 a 31,25 pg/ml. Detekční limit metody je 7 pg/ml.

1.3 FIBRONEKTIN

Fibronectin je hlavní molekula extracelulární (EC) matrix. Je též součástí tubulární bazální membrány a jeho exprese se zvyšuje u tubulointersticiální fibrózy spojené s chronickou rejekcí. Jak známo, rejekce štěpu (akutní i chronická) je spojena s buněčnou infiltrací, zvýšením exprese adhezivních molekul a molekul EC matrix. Fibronectin je glykoprotein skládající se z opakujících se sekvencí aminokyselin vytvářejících tak domény, které umožňují interakce s různými buňkami prostřednictvím integrinových i neintegrinových receptorů. Z integrinových receptorů jsou to např. tzv. VLA-4 (very late activation) antigeny patřící mezi integriny β 1 podskupiny, která zahrnuje řadu receptorů pro glykoproteiny extracelulární matrix (kolagen, laminin, fibronectin).

Molekuly fibronectinové rodiny hrají důležitou roli v procesech buněčné adheze, migrace, diferenciaci a proliferaci. Fibronectin je secernován celou řadou buněk jako např. hepatocyty, fibroblasty, epiteliálními buňkami a makrofágy. Uvolněný fibronectin se pak může stát součástí EC matrix.¹¹

Jsou popisovány klinické stavy spojené s vysokou expresí fibronectinu jako např.: intersticiální plicní procesy, glomerulární skleroza, hojení ran, revmatoidní artritida a malignity. Fibronectin má důležitou imunomodulační roli. Ukázalo se, že má modulační

vliv na buněčnou imunitní odpověď a proto by plazmatické hladiny této molekuly mohly být užitečným ukazatelem při monitorování pacientů po transplantaci ledviny.¹² Byla popsána vyšší exprese fibronektinu v intersticiu a cévním kompartmentu u akutních a chronických rejekcí¹³.

1.4 NÁSTROJE KE STUDIU ROLE TGF- β V EXPERIMENTÁLNÍ TRANSPLANTOLOGII A V KLINICE, IMUNOSUPRESE

Na etiologii chronické rejekce (chronické transplantační nefropatie) se podílí řada aloantigeně závislých i nezávislých faktorů. Ischemicko/reperfuzní poškození (I/R) jakožto aloantigeně nezávislý faktor stojí na začátku celého procesu a hypertenze je jedním z nejdůležitějších aloantigeně nezávislých faktorů, které ovlivňují progresi chronické rejekce transplantované ledviny.¹⁴

1.4.1 Experimentální modely

1.4.1.1 Ischemicko/reperfuzní poškození (I/R)

Ischemicko/reperfuzní poškození (I/R) představuje komplex interakcí zprostředkovaný především endotelem a aktivovanými leukocyty. Ve svém důsledku vede k poškození buněk až buněčné smrti. Určitý stupeň I/R poškození je nevyhnutelný následek vlastní transplantace a je známo, že významně ovlivňuje osud transplantovaného orgánu (*příloha 1*). Ačkoliv zavedení lepších konzervačních roztoků do klinické praxe vedlo ke snížení rozsahu a závažnosti ischemického poškození, zůstává I/R poškození štěpů nadále velkým problémem (*příloha 1*).

I/R je nejdůležitějším aloantigenně nezávislým faktorem. Chronické změny se vyvíjejí i v případě transplantace isoštěpů, takže prezentace aloantigenu není nezbytnou podmínkou rozvoje chronické rejekce. V současnosti je ovšem přijímána hypotéza, že I/R poškození stojí na počátku zvýšení imunologické reaktivity příjemce.¹⁵

Morfologické změny shodné s chronickou rejekcí byly pozorovány také v případě syngenních transplantací mezi geneticky identickými dvojčaty, kde HLA bariéra neexistuje. Výše uvedené chronické změny byly pozorovány v experimentálním modelu při transplantaci isoštěpů¹⁶. Z těchto pozorování je možné usuzovat na silný vliv aloantigen nezávislých mechanismů na dlouhodobé výsledky transplantací ledvin¹⁵. Azuma a kol. zjistili, že se tyto chronické změny vyvíjejí po úvodním ischemicko/reperfuzním poškození, a to jen v případě kdy byla redukována masa nefronů na 50% (kontralaterální nefrektomií), když byly ponechány obě ledviny in situ, tak se tyto změny neobjevily. Z toho je možno usuzovat, že dostatečně dlouhá ischemie jedné ledviny (45 minut) je významným na aloantigenu nezávislým rizikovým faktorem pro pozdější alteraci renální funkce a následné renální selhání. Toto zjištění bylo podpořeno také imunohistologickou a molekulárně-biologickou analýzou včetně zvýšení exprese genů pro klíčové růstové faktory (TGF- β).¹⁷

Mechanismus I/R je sice společný pro všechny orgány, ale existují jisté zvláštnosti specifické pro každý orgán. Důsledky I/R závisí na délce trvání ischemie, teplotě, druhu konzervačního roztoku a typu postiženého orgánu. Situace v ledvině během I/R je o to složitější, neboť ischemie je následována reperfuzním poškozením tkáně a někdy také irreverzibilním poškozením tubulů¹⁸.

Buněčná smrt vzniklá v důsledku I/R poškození může být způsobena dvěma mechanismy-apoptózou nebo nekrózou¹⁹. Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt („buněčná sebevražda“) je fyziologický proces, kterým jsou odstraňovány staré, poškozené

či abnormální buňky. Je spouštěna endonukleázami a charakterizována fragmentací DNA. Apoptotické buňky jsou následně pohlceny makrofágy nebo sousedními buňkami bez uvolnění proteolytických enzymů nebo toxických kyslíkových radikálů. Tento proces tak není spojen se zánětlivou reakcí. Nekróza je patologický proces, který postihuje populace buněk a vede k místnímu poškození tkáně, zánětlivé reakci a často má i vážné systémové následky.

V ledvině bývá ischemické poškození většinou nacházeno ve vnitřním pruhu zevní dřeně. Přesto je však popisována heterogenní distribuce apoptotických i nekrotických buněk. Zdá se však, že apoptóza je častější v distálních tubulech a nekróza se objevuje spíše v proximálních tubulech.¹⁹

Analogií I/R poškození v transplantované ledvině je post-transplantační akutní tubulární nekróza (ATN). Klinicky se projevuje jako opožděný rozvoj funkce štěpu a může se definovat jako doba vyžadující dialýzu po transplantaci. Incidence post-transplantační ATN se pohybuje v rozsahu od 4% do více než 40%.²⁰

Úprava renálních funkcí po ischemickém akutním renálním selhání závisí především na regeneraci struktury a funkce proximálních tubulů. Tubulární buňky proliferují, migrují do obnažené oblasti bazální membrány a dávají vznik novému epitelu. Epidermální růstový faktor (EGF), inzulinu podobný růstový faktor-1 (IGF-1), hepatocytární růstový faktor (HGF) a TGF- β jsou známými regulačními faktory procesu regenerace tubulárních struktur po I/R poškození.¹⁹ Přechodný vzestup těchto růstových faktorů je dobře popsán a celková regenerace tubulů může trvat až 6 týdnů. Nicméně v závislosti na trvání a tíži ischemie, přítomnosti dalších poškozujících faktorů, může být tento proces hojení prodloužen a vést až do stadia fibrózy orgánu. V transplantované ledvině je TGF- β exprimován převážně²¹ nebo výlučně na tubulárních buňkách²². Byly zjištěny pozitivní korelace mezi expresí aktivního TGF-beta (TGF- β 1) a fibrózou štěpu,

resp. chronickou rejekční nefropatií²³ nebo poklesem funkce štěpu²². TGF- β 1 má tedy na jedné straně proregenerační efekt na tubuly v časně fázi po I/R poškození, ale na druhé straně se jako klíčový profibrogenní cytokin dále uplatňuje v patogenezi chronické rejekce a redukce masы nefronů¹⁷.

1.4.1.2 Hypertenze a renin – angiotenzinový systém

Hypertenze je nejenom rizikovým faktorem rozvoje aterosklerotických změn, ale podílí se značnou měrou na progresi většiny chronických nefropatií²⁴. Systémová hypertenze vede ke zvýšení intraglomerulárních tlaků. Jejich následkem dochází k poškození glomerulárních mesangiálních buněk a následné expresi extracelulární matrix vedoucí ke glomeruloskleróze.²⁵

Hypertenze ovšem může být také jeden z projevů chronické dysfunkce transplantované ledviny a nebo může vzniknout v souvislosti s léčbou cyklosporinem A. Etiologie hypertenze po transplantaci je tedy nejčastěji multifaktoriální. Ať již jako příčina či následek chronické rejekce, hypertenze po transplantaci ledviny významným způsobem snižuje dlouhodobé přežití štěpů i příjemců.²⁴

Transgenní potkani (transgenic rat, oficiální název kmen TGR(mREN-2)-27) představují experimentální model hypertenze závislé na angiotenzinu II²⁶. Tento kmen potkanů byl vytvořen přenosem myšího ren-2 reninového genu do genomu potkanů kmene Hanover Sprague-Dawley (Han SD)²⁷. U transgenních potkanů (mRen-2)-27 se v důsledku přenosu myšího ren-2 genu vyvine silná hypertenze. Transgenní hypertenzní potkani se od normotenzních kontrol liší pouze přítomností tohoto jediného genu pro renin. U těchto potkanů je tak vývoj hypertenze spojen s přítomností tohoto jediného genu a tedy s renin-angiotenzinovým systémem (RAS). Tato zvířata tak představují jasně definovaný model hypertenze s vysokou produkcí reninu a angiotenzinu II.

Renin-angiotenzinový systém (RAS) hraje důležitou roli v patofyziologii hypertenze a podílí se na progresi renální insuficience autologních ledvin stejně tak jako na progresi chronické rejekce transplantované ledviny²⁸. Experimentální terapeutická blokáda RAS má vedle antihypertenzních účinků také účinky antiproliferační (mechanismem zahrnujícím snížení exprese genů pro růstové faktory), takže mimo funkční redukcí proteinurie dochází také ke zpomalení progresu chronických nefropatií. Angiotenzin II hraje v procesu chronické rejekce důležitou roli. Použitím blokátorů angiotenzin konvertujícího enzymu a nebo blokádou receptoru pro angiotenzin II bylo dosaženo potlačení manifestace chronických rejekčních změn v experimentálních modelech.^{29,30} Z toho se usuzuje na významnou úlohu RAS v progresi chronické rejekce transplantované ledviny. Inhibitory ACE omezují nejenom hyperfiltraci, ale také děje, které vyústí v konečnou fibrózu.

Jedním z účinků ACE inhibitorů je snížení rezistence eferentní arterioly vyvolané angiotenzinem II. Ten je také růstovým faktorem pro glomerulární a tubulární buňky a může přímo indukovat syntézu kolagenu. Tento účinek je zprostředkován růstovými faktory TGF- β 1 a PDGF-A. Navíc angiotenzin II stimuluje adhezi monocytů k mezangiálním buňkám a chemotaxi makrofágů a lymfocytů. U transplantované ledviny může inhibice ACE nejenom efektivně snížit krevní tlak, ale také příznivě působit na lokální renin-angiotenzinový systém a redukovat expresi cytokinů a růstových faktorů³¹. Rovněž blokáda receptoru AT₁ pro angiotenzin II losartanem vedla k signifikantnímu zlepšení proteinurie i morfologických změn v experimentálním modelu³². Pomocí molekulárně-biologických metod bylo zjištěno, že výše uvedená blokáda vede ke snížení exprese TGF- β a také mRNA pro fibronectin (protein extracelulární matrix) a PAI-1 (inhibitor aktivátoru plazminogenu typ 1). Z toho se usuzuje na význam TGF- β a zřejmě i dalších profibrogenních růstových faktorů pro vývoj fibrózy, ať již v modelu chronické

rejekce, či renální fibrózy.³³ V experimentálních modelech tak blokáda renin-angiotenzinového systému účinně ovlivnila rozvoj chronické rejekce.

1.4.1.3 Chronická rejekce

Chronická rejekce (CR) představuje vedle úmrtí příjemce nejčastější příčinu ztráty funkce transplantované ledviny v dlouhodobém průběhu³⁴. Tato špatně definovaná klinicko-patologická jednotka postihuje všechny transplantované orgány. Stále probíhají diskuze týkající se nomenklatury, charakteristiky a patogenze chronické formy rejekce. Chronická transplantační nefropatie, CTN (chronic allograft nephropathy - CAN) je popisný pojem histologických změn pozorovaných v ledvinných biopsiích.

V biopsiích s CTN se vyskytuje ateroskleróza, glomeruloskleróza, intersticiální fibróza a tubulární atrofie.³⁵ Poškození pozorovaná v rámci CTN mohou být v důsledku nefrotoxicity způsobené používanými imunosupresivními léky (hlavně inhibitory kalcineurinu)³⁶, rekurentních nebo de novo vzniklých glomerulonefritid³⁷, dalších (neznámých) faktorů jako například stenózy renální tepny³⁸. Konečně CTN může být výsledkem rejekčních epizod, buď jako reziduálního poškození po proběhlých epizodách akutní rejekce nebo právě probíhající chronické rejekce (CR). Chronická rejekce je tedy proces nastupující většinou od šesti měsíců po transplantaci ledviny, ale v některých případech i dříve. Klinicky se projevuje pomalým, nicméně progresivním poklesem glomerulární filtrace většinou doprovázeným malou proteinurií a arteriální hypertenzí.³⁹

Morfologickým korelátem chronické rejekce jsou změny cév, glomerulů i tubulointersticia, a dochází k infiltraci mononukleáry. Vaskulární změny jsou charakteristické koncentrickým ztluštěním intimy obsahující proliferující buňky hladké svaloviny medie s depozicí extracelulární matrix. Peritubulární kapiláry mají ztluštěnou a někdy vrstvenou bazální membránu. Glomerulární změny jsou různorodé. Zahrnují kolaps

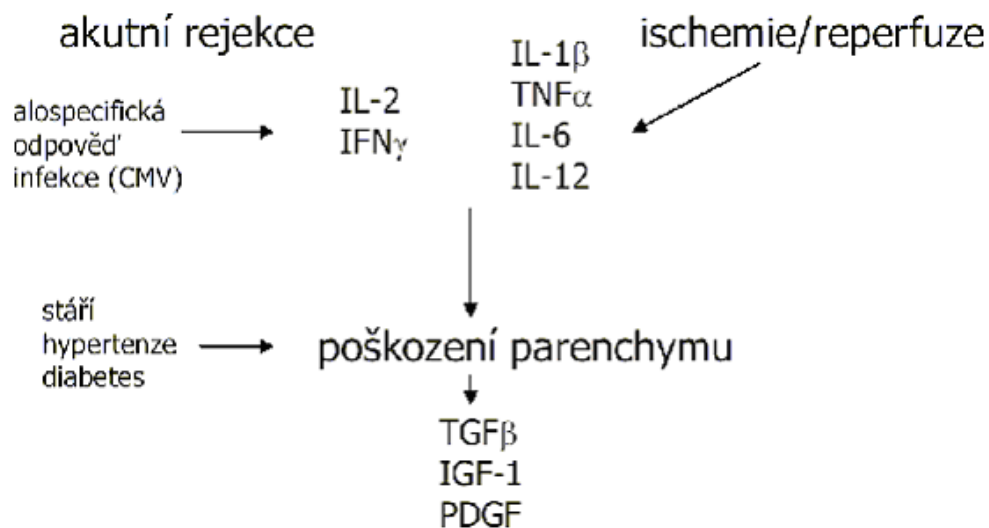
kapilárních kliček, hypertrofii až expanzi mezangia a fokální glomerulosklerózu. Intersticiální fibróza a tubulární atrofie jsou dalším charakteristickým histologickým znakem přítomným ve většině štěpů postižených chronickou rejekcí.⁴⁰ Imunofenotypizací mononukleárních buněk bylo zjištěno, že většinu z nich tvoří makrofágy, T lymfocyty (převážně CD4 pozitivní), méně pak plazmatické buňky a NK buňky⁴¹. Tyto změny mají za následek zmenšení počtu funkčních nefronů, alteraci a pozvolný zánik funkce štěpu.

V etiologii procesu chronické rejekce se uplatňují aloantigeně závislé rizikové faktory (akutní rejekce, nepřímá prezentace aloantigenu, rozdíl v MHC mezi dárce a příjemcem) a aloantigeně nezávislé faktory (ischemie/reperfuze, rizikové faktory aterogeneze, infekce, hypertenze, hyperlipidémie, nefrotoxicita-Cs-A, FK 506, redukce masы nefronů, věk dárce, pohlaví dárce, mozková smrt).¹⁴

Důsledkem působení těchto faktorů je poškození buněk endotelu a jejich následná aktivace. Ta se projevuje expresí adhezivních molekul (ICAM-1, VCAM-1, P a E-selektiny), které usnadňují adhezi a diapedézu mononukleárů cévní stěnou. Poškozený endotel také secernuje řadu chemokinů (IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES), které se uplatňují v usnadnění migrace leukocytů směrem ke štěpu. Endotel dále exprimuje HLA antigeny I. a II. třídy, je schopen prezentace antigenu a podílí se rovněž na kostimulaci CD4⁺ T lymfocytů. Mimoto je schopen uvolňovat některé cytokiny (TNF- α) či růstové faktory (PDGF - z destiček odvozený růstový faktor), které se uplatňují spolu s dalšími chemokiny jako chemoatraktant pro makrofágy. Na druhé straně lymfocyty exprimují řady dalších cytokinů (IL-1, IL-4, IFN- γ , TNF- α), které se podílejí pozitivní zpětnou vazbou na usnadnění lymfocytární adheze na endotel tím, že zvyšují expresi adhezivních molekul.⁴² Vcestovalé mononukleární buňky produkují řadu cytokinů a růstových faktorů, které se podílejí na další progresi chronické rejekce.

Významnou roli v celém procesu hrají makrofágy. Růstové faktory exprimované makrofágy a lymfocyty vedou k aktivaci buněk hladkého svalstva cév. Bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) vede ke zvýšení proliferace a PDGF pak k migraci buněk hladkého svalstva cév do intimy cév. Zde pak tyto buňky produkují komponenty extracelulární matrix (kolagen IV), což se projevuje intimální proliferací a následnou okluzí. V intersticiu pak makrofágy mohou produkovat některé komponenty extracelulární matrix (např. laminin) nebo se prostřednictvím TGF- β podílí na proliferaci fibroblastů s následným ukládáním komponent extracelulární matrix (např. fibronektin).⁸ TGF- β se dále podílí na zvýšení syntézy IV. typu mezangiální kolagenázy, která hraje důležitou roli v remodelaci glomerulární matrix.

Opakováním výše uvedených procesů pak dochází k vystupňování chronických změn, které vedou až ke ztrátě funkce transplantované ledviny (obr. č. 4).



Obr.č. 4 Rozvoj chronické dysfunkce alotransplantátu (rejekce).

O stárnutí jako jednom z faktorů, který se spolupodílí na poškození ledvinného parenchymu a tím i na progresi chronické rejekce pojednává *příloha 2*.

1.4.2 Protokolární biopsie štěpu u pacientů po transplantaci ledviny jako nástroj ke studiu role TGF- β v klinické transplantologii

Biopsie štěpu po transplantaci ledviny se provádějí zpravidla při snížení funkce štěpu s cílem odhalit příčinu a umožnit tak další postup včetně optimalizace léčby. V posledních letech se začaly provádět protokolární biopsie štěpu v určitém, předem stanoveném časovém úseku po transplantaci. Hlavním cílem protokolární biopsie je odhalení subklinické akutní rejekce. Již delší dobu je známo, že prodělaná akutní rejekce je jedna z hlavních příčin chronické transplantační nefropatie^{43,44}. Protokolární biopsie představují možnost jak studovat výskyt a rizikové faktory vzniku chronické transplantační nefropatie v daných časových úsecích. V období časně po transplantaci (do 3-6 měsíců) je jejich hlavním cílem odhalení subklinických akutních rejekcí, později pak chronické rejekce.⁴⁵

Chronická transplantační nefropatie, CTN (chronic allograft nephropathy – CAN) představuje druhou nejčastější příčinu ztráty funkce transplantované ledviny. Klinickým korelátem je zhoršení funkce štěpu, vysoký krevní tlak a proteinurie. Histologickým korelátem je intersticiální fibróza a tubulární atrofie, v pozdějších stádiích onemocnění jsou patrné intimální hyperplazie a glomerulopatie.^{35,41}

Vzhledem k obtížnému stanovení diagnózy chronické rejekce (chronické transplantační nefropatie, CTN) na základě klinických parametrů byla navržena protokolární biopsie jako metoda, která je vhodná k časnému odhalení CTN.

Biopsie jsou prováděny z konvexity štěpu automatickou jehlou o síle 16 Gauge po sonografickém zaměření. Histologické vzorky jsou hodnoceny podle kritérií Banffské 97' klasifikace. Pro hodnocení biopsických nálezů byla v devadesátých letech minulého století vypracována řada klasifikačních systémů (banffský, bostonský, basilejský aj.).

Nejrozšířenější je dnes klasifikace vyhlášená v roce 1991 v kanadském Banffu, upřesněná a přepracovaná o 6 let později. Je jednoduchá a srozumitelná, (semi)kvantitativní hodnocení však převládalo nad posouzením kvality změn (zvláště časných i pozdních cévních lézí). V roce 1997 proto trojice autorů zhodnotila soubor 1400 biopsií ledvinného štěpu u více než 700 pacientů se zřetelem na kvalitativní aspekt rejekční léze, v banffském systému dosud opomíjený.³⁵ Hlavní závěry z této studie zůstávají v platnosti dodnes. Nově je definovaná kategorie „akutní humorální rejekce“ s peritubulární kapilární depozicí frakce komplementu C4d, která tehdy ještě nebyla známa. Většina rejekčních lézí však souvisí s celulární imunitní odpovědí.

Názory na účelnost prováděných protokolárních biopsií nejsou zcela jednotné^{46, 47}. Nesporný je však jejich význam výzkumný, zvláště pro studium chronické transplantační nefropatie (CTN). Z dnešního pohledu již není překvapením její vysoký výskyt brzy po transplantaci. V současnosti nejvíce citovaná práce Nankivella a kol. prokázala, že ve 12. měsíci po transplantaci je CTN přítomna u více než 90 % všech protokolárních biopsií⁴⁸. Protokolární biopsie po transplantaci ledviny se provádějí i u nás. V našem souboru se chronická transplantační nefropatie vyskytla ve 12. měsíci u 71 % nemocných (*příloha 5*).

Protože je výskyt CTN v protokolárních biopsiích vysoký a přitom většina nemocných má ještě téměř normální nebo přinejmenším stabilní funkci transplantované ledviny, je jasné, že přítomnost CTN v 6. nebo ve 12. měsíci představuje zjevné riziko pro dlouhodobou funkci transplantované ledviny. Předmětem současného výzkumu je identifikace rizikových faktorů ovlivňujících časný vznik chronické transplantační nefropatie.

1.4.3 Imunosupresivní terapie

1.4.3.1 Imunosupresiva

Nejlepší metodou náhrady funkce vlastních ledvin je transplantace ledviny. U nemocného s úplným zánikem funkce ledvin je jedinou alternativou dialýza. Úspěšnost transplantace ledviny závisí mimo jiné na ovlivnění imunitní reakce příjemce na transplantovanou ledvinu podáváním vhodných imunosupresiv. Klasické imunosupresivní schéma je dnes založeno na trojkombinaci (1) kalcineurinového inhibitoru (cyklosporin A); (2) antiproliferativní látky (azathioprin); a (3) kortikosteroidů (prednison).

Z historického hlediska první průlom v imunosupresivní léčbě představovalo zavedení steroidů v roce 1950. Dalším mezníkem bylo zavedení 6-merkaptopurinu v roce 1959. Od roku 1961 byl 6-merkaptopurin nahrazen azathioprinem, který je používán dodnes. Významným mezníkem byl však rok 1970, kdy byl Borelem objeven cyklosporin A a od roku 1983 se stal základním kamenem imunosuprese. V posledních letech přicházejí do klinického užití mykofenolát mofetil, sirolimus, everolimus, basiliximab, daklizumab. Další imunosupresivní preparáty jsou ve fázi laboratorního zkoušení (obr. č. 5).

U lidí, kteří podstoupí transplantaci ledviny je potřeba celoživotní léčba imunosupresivy. Při výběru této léčby je nutno balancovat mezi rizikem imunitní reakce příjemce na transplantovanou ledvinu, která vede k rejekci transplantované ledviny a nežádoucími účinky léků pro příjemce. Cílem léčby je prodloužení života pacienta i štěpu.

Komplikace imunosupresivní léčby zahrnují zvýšený výskyt infekcí, včetně virových, jako je infekce cytomegalovirem, virem herpes simplex a zoster, případně Epstein-Barr, oportunních protozoálních, mykotických a bakteriálních infekcí. Potlačení imunitního systému je také spojeno s vývojem malignit, převážně lymfoproliferativních onemocnění.

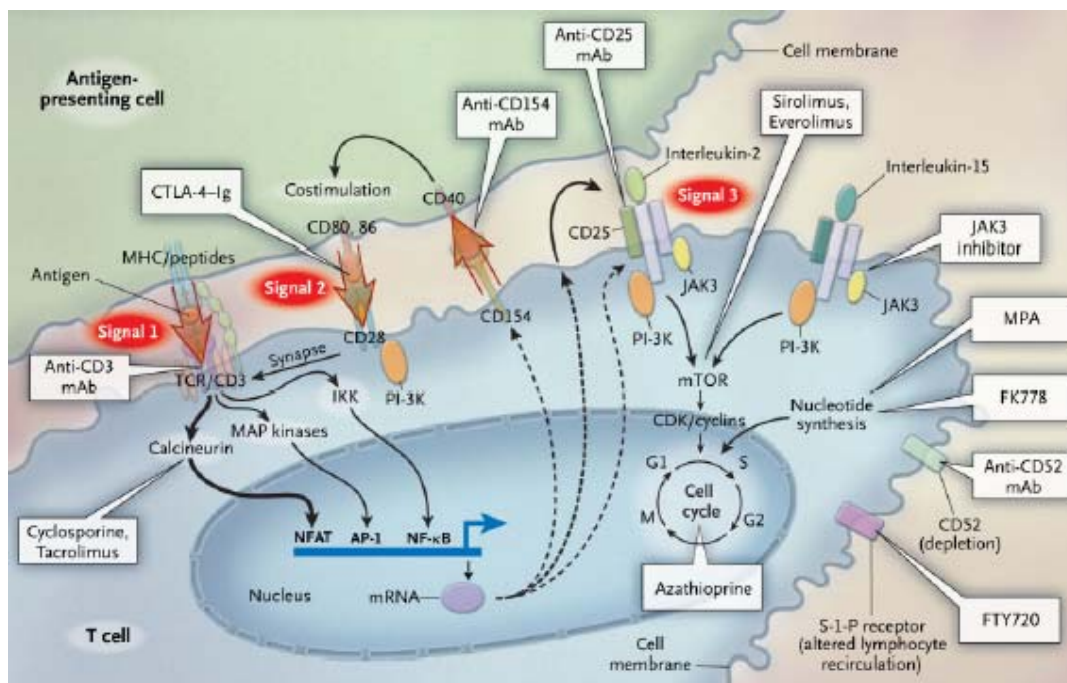
Dalšími nežádoucími účinky je dyslipidémie, hypertenze, de-novo výskyt diabetu, ale také nefrotoxicita. Ta je spjata hlavně s užíváním inhibitorů kalcineurinu a může zvyšovat riziko vývoje chronické rejekce.⁴⁹

V současnosti je známa celá řada postupů, kterými lze ovlivnit chronickou rejekci. Naprostá většina poznatků však pochází ze základního výzkumu. Týkají se především blokády kostimulačního signálu a možnosti genové terapie^{50,51}. Potlačení akutní i chronické rejekce a navození dlouhodobé imunotolerance se v současné době dosahuje podáváním chemických látek s imunosupresivním účinkem. V posledním desetiletí se rozšířila nabídka nových imunosupresiv o některá farmaka včetně protilátek, jejichž hlavní indikací jsou orgánové transplantace. Hlavní nevýhodou imunosupresiv obecně je jejich nespecifické působení. Proto je vyvíjena snaha získat látky s cíleným imunosupresivním působením.

Imunosupresiva jsou používána v prevenci rejekce štěpu a to v rámci indukční, iniciální a udržovací terapie a jako léčba akutních rejekčních epizod. Indukční terapie je intenzivní imunosuprese podávaná po dobu 2 týdnů ihned po operaci s cílem „přepnutí“ imunitního systému po transplantaci a snížení pravděpodobnosti akcelerované a akutní rejekce. K tomuto účelu jsou používány polyklonální protilátky: antilymfocytární globulin (ALG), antithymocytární globulin (ATG) a anti-CD3 monoklonální protilátka (muromonab). Iniciální terapie (0-3 měsíce po transplantaci) zahrnuje klasické trojkombinační imunosupresivní schéma (kalcineurinový inhibitor, kortikosteroid a azathioprin). Udržovací terapie je pak následná léčba, kterou pacienti dostávají dlouhodobě po celé období přežívání štěpu a která je často shodná s iniciální terapií. Rozdíl je pouze v dávkování, které je redukováno s časem se zvyšující imunologickou stabilitou štěpu. Tato terapie však může být měněna z důvodu výskytu akutní rejekce, těžké infekce nebo toxicity. Důvodem ke změně je také nesnášenlivost léčby.

Udržovací terapie musí být někdy přizpůsobena probíhající akutní rejekční epizodě. Epizody akutní rejekce (AR) jsou nejčastěji pozorovány v prvních týdnech po transplantaci, ale mohou se objevit kdykoliv, pokud je imunosuprese nedostatečná. AR je zprostředkována buněčnými efektorovými mechanismy a ve většině případů je úspěšně léčitelná vysokými dávkami kortikoidů. Jestliže však nereaguje na kortikoidní terapii, označuje se jako „kortikoid-rezistentní akutní rejekce“ a ta je pak léčena polyklonálními protilátkami ALG nebo ATG nebo anti-CD3 monoklonální protilátkou nebo přechodem na vysoké dávky tacrolimu.⁴⁹ V blízké budoucnosti lze očekávat následující trendy: individualizace imunosupresivní terapie, odstranění kortikoidů, ale také cyklosporinu A vzhledem k jeho nefrotoxicitě při dlouhodobé aplikaci.

V experimentální části jsme studovali vliv imunosupresiva sirolimu na rozvoj chronické rejekce a v klinické části byly hodnoceny soubory pacientů s různými typy imunosuprese, proto považujeme za vhodné popsat systematicky imunosupresivní látky.



Obr.č. 5 Mechanismus působení imunosupresiv-signalizační kaskáda.

1.4.3.2 Rozdělení imunosupresiv

A) FARMAKA

- I. Glukokortikoidy
- II. Látky antiproliferativní (azathioprin, mykofenolát mofetil)
- III. Inhibitory kalcineurinu (cyklosporin A, tacrolimus)
- IV. Inhibitory TOR (sirolimus, everolimus)
- V. Inhibitory cirkulace lymfocytů (FTY 720)

B) PROTILÁTKY

- I. Polyklonální protilátky (ATG, ALG)
- II. Monoklonální protilátky
 - a) proti rozpoznávacím molekulám
(anti-CD3, anti-CD4, anti-CD52)
 - b) proti receptorům pro interleukin-2
 - c) proti adhezivním molekulám
(anti-ICAM, anti-LFA1)
 - d) proti kostimulačním molekulám
(fúzní protein CTLA-4Ig, anti-B7 monoklonální protilátka)

1.4.3.2.1 Farmaka

I. Glukokortikoidy

Tyto látky jsou známé svým komplexním účinkem na imunitu. Používají se v kombinaci s jinými imunosupresivními látkami v prevenci rejekce štěpu. Modulují expresi četných genů, inhibují tak tvorbu IL-1 a IL-2 a tím potlačují imunitní reakce závislé na T-buňkách.

Předpokládá se, kortikoidy interferují s buněčným cyklem aktivovaných lymfoidních buněk. Jsou výrazně cytotoxické k určitým subformám T-buněk, ale jejich imunologické účinky jsou způsobeny spíše schopností modifikovat buněčné funkce, než přímou cytotoxicitou. Inhibují produkci zánětlivých mediátorů včetně destičkového aktivačního faktoru, leukotrienů, prostaglandinů, histaminu, bradykininu. V monocytech a neutrofilech kortikoidy snižují chemotaxi a baktericidní a fungicidní aktivitu, nemění však jejich fagocytární schopnost.

Kortikoidy ovlivňují i distribuci leukocytů, mohou způsobit lymfopenii a neutrofilii. Inhibicí produkce IL-1 monocyty mohou vést k poklesu IL-2 a interferonu γ (INF- γ). Hlavními představiteli jsou prednison a metylprednisolon.⁵²

II. Látky antiproliferativní

K látkám antiproliferativním patří některá cytostatika, např. azathioprin (blokátor purinů; vytváří se z něj 6-merkaptopurin), cyklofosfamid a chlorambucil (alkylující látky) a methotrexát (antimetabolit; antagonist kyseliny listové).

Mykofenolát mofetil

Nověji k inhibitorům DNA přibyl mykofenolát mofetil (MMF), semisyntetická sloučenina, ester kyseliny mykofenolové, který je izolován z houby *Penicillium glaucum*. MMF se řadí k antimetabolitům. V organismu se metabolizuje na aktivní metabolit kyselinu mykofenolovou, která inhibuje enzym inosinmonofosfát dehydrogenázu. Takto je blokována *de novo* cesta výstavby guanosin nukleotidů potřebných pro syntézu DNA. Protože lymfocyty na rozdíl od jiných buněk jsou vybaveny pouze touto cestou, umožňuje její blokáda specifický antiproliferativní účinek pouze na lymfocyty.⁵³ Podobně působící antimetabolit azathioprin má účinek nescifický, působí i na jiné buňky. Mykofenolát mofetil tak potlačuje proliferaci lymfocytů a tvorbu protilátek B-buňkami, může inhibovat i transport leukocytů do míst zánětu deplecí leukocytárních guaninových nukleotidů a inhibicí glykosylace lymfocytárních glykoproteinů, které se účastní při adhezi na endoteliální buňky.⁵⁴ Používá se již běžně jako součást profylaktické imunosuprese v trojkombinaci s inhibitory kalcineurinu a kortikoidy. Chronickou rejekci však MMF patrně neovlivňuje⁵⁵. K nežádoucím účinkům patří gastrointestinální projevy (průjemy, zvracení) a poruchy hematologické (leukopenie, anemie, trombocytopenie)⁵⁶.

III. Inhibitory kalcineurinu

Cyklosporin A

Mimořádný pokrok moderní transplantační medicíny byl umožněn zavedením cyklosporinu A (Cs-A), polypeptidu získaného z plísni *Tolypocladium inflatum*. Cs-A je blokátor kalcineurinu (CN), jehož mechanismus účinku spočívá v inhibici produkce interleukinu 2. Jeho hlavní účinek tak spočívá v útlumu funkce pomocných T lymfocytů. V buňkách se váže na cyklofilin, což je cytosolový receptor, který inhibuje fosfatázu kalcineurinu. Tento komplex blokuje kalcineurin a tím přenos signálu do jádra a tvorbu

některých cytokinů včetně IL-2. Z nežádoucích účinků má největší význam nefrotoxicita, která vede v některých případech k progresivní alteraci renálních funkcí. Morfologické projevy cyklosporinové nefrotoxicity a chronické rejekce mohou být někdy dosti podobné.⁵⁷ Cyklosporin k použití *per os* je dostupný ve dvou formách. Původně jako olejový roztok (Sandimmun Consupren®), nyní jako mikroemulze, a to i ve formě měkkých želatinových kapslí (Sandimmun Neoral®, Equoral®). Farmakokinetické profily obou přípravků se liší.⁴⁹

Tacrolimus (TAC)

Tato látka je fermentativní produkt z kmene *Streptomyces tsukubaensis*. Toto makrolidové antibiotikum tacrolimus (Prograf®) je nové, vysoce účinné imunosupresivum, jehož mechanismus působení je podobný cyklosporinu. Váže se sice intracelulárně na jiný imunofilin (FKBP), ale rovněž blokuje kalcineurin a v konečném důsledku pak přepis genů pro některé cytokiny.⁵⁸ Přestože má obdobný mechanismus účinku jako Cs-A, v klinice se potvrdila jeho vyšší imunosupresivní účinnost, projevující se zejména v nižším výskytu akutních rejekcí. Proto se začíná stále více prosazovat jako alternativa cyklosporinu A do kombinované chronické imunosupresivní léčby u transplantací jater a ledvin. Jiné možné použití TAC je v záchranné terapii v případě steroid/OKT3 rezistentních rejekcí u transplantací ledvin. Některé nežádoucí účinky jsou obdobné jako u Cs-A (nefrotoxicita), častěji se u TAC vyskytuje neurotoxicita a diabetogenní účinek. Hypertenze a hyperlipidemie jsou méně časté, hirsutismus a gingivální hypertrofie se u TAC téměř nevyskytují.⁵⁹ V experimentálním modelu chronické rejekce bylo prokázáno, že zabránil zvýšení exprese bFGF, významného růstového faktoru uplatňujícího se v patogenezi chronické rejekce⁶⁰.

IV. Inhibitory TOR

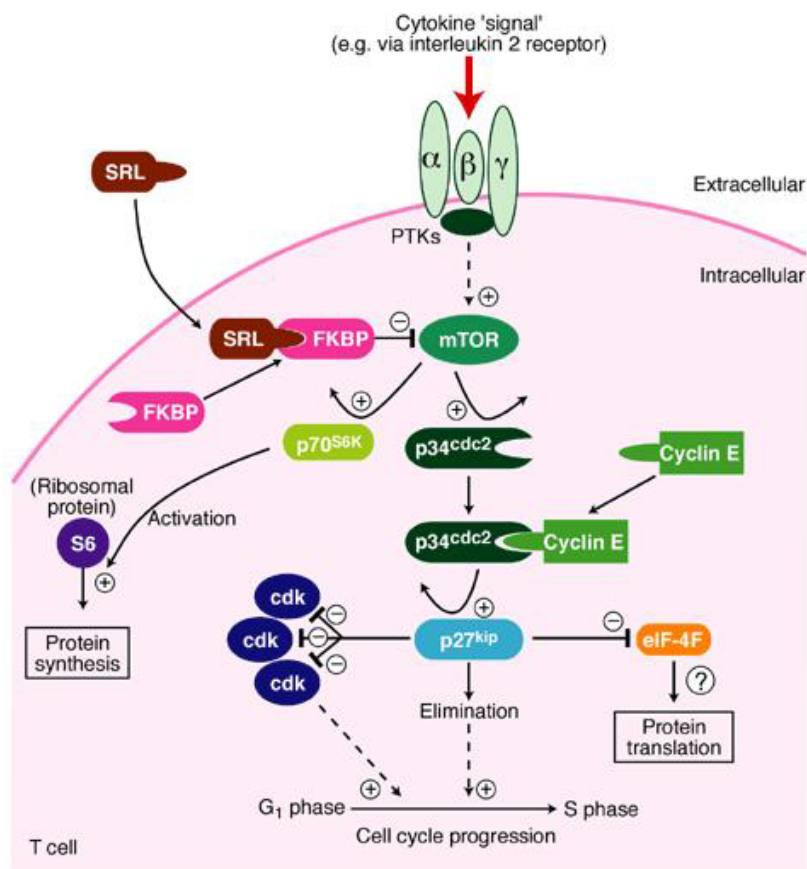
Sirolimus, everolimus

Příkladem úspěšného medikamentózního ovlivnění rozvoje chronické rejekce v experimentálních modelech je imunosupresivum sirolimus (rapamycin, Rapamune®), které má mimo svého účinku imunosupresivního také antiproliferační vlastnosti⁶¹. Protože i my jsme v naší experimentální práci používali imunosupresivum sirolimus, zmíním se o něm podrobněji.

Sirolimus je hlavním představitelem látek, které blokují odpověď na lymfokiny. Je to makrolidové antibiotikum tvořené plísní *Streptomyces hydroscopicus*. Strukturálně se podobá tacrolimu a váže se na identickou skupinu imunofilinů (FKBP 12; FK506-binding protein), ale vazbou je aktivován jiný mechanismus: zatímco tacrolimus a cyklosporin dosahují supresivního účinku inhibicí fosfatázy kalcineurinu, cílem sirolimu jsou jeho efektorové proteiny (proteiny rapamycinu). Ty byly poprvé identifikovány u plísní (TOR: target of rapamycin) a později také u savců (RAFT1/FRAP: rapamycin and FKBP target, FKBP and rapamycin associated protein). Bylo prokázáno, že po vazbě sirolimu na tyto efektorové proteiny dochází k inhibici buněčného cyklu v pozdní G1/S fázi a to mechanismem, který zahrnuje blokádu fosforylace ribozomálního proteinu p70 S6 kinázy. Tento jaderný enzym je nezbytný pro přechod jedné fáze buněčného cyklu do druhé. Rovněž bylo prokázáno, že rapamycin blokuje intracelulární signalizaci k jaderným proteinům-cyklin dependentním kinázám (cdk2, cdc2), které jsou rovněž nezbytné pro plynulý přechod buněčného cyklu (obr. č. 6).⁶²

Sirolimus tedy nebrzdí tvorbu cytokinů, jako jsou např. interleukin-2, 4, 7, 12, 15, destičkový růstový faktor a interferon- γ aktivovanými T-buňkami, ale blokuje odpověď T-buněk na tyto cytokiny. Sirolimus tak účinkuje v pozdější fázi aloimunitní reakce než kalcineurinové inhibitory a blokuje až proliferaci lymfocytů, která je indukována IL-2⁶³.

Navíc je silným inhibítorem B-buněčné proliferace a produkce imunoglobulinů⁶⁴. Sirolimus je slabší inhibitor syntézy cytokinů než jsou cyklosporin A a tacrolimus.



Obr.č. 6 Mechanismus působení sirolimu.

(převzato z Expert Reviews in Molecular Medicine © 2000 Cambridge University Press)

Charakteristickým účinkem sirolimu je inhibice signálů růstových faktorů k imunokompetentním buňkám stejně tak jako k somatickým buňkám. Tento antiproliferativní účinek se týká např. fibroblastů, endotelií a buněk hladkého svalu cév.⁶¹

Právě tento mechanismus účinku je důvodem nadějí vkládaných do sirolimu jako přípravku ovlivňujícího chronickou rejekci. Jeho výhodou je nepřítomnost nefrotoxicity, jsou však přítomné jiné nežádoucí účinky, a to útlum krvevorbny a zejména hypercholesterolemie a hypertriglycerolemie⁶⁵. Hydroxylovaným derivátem sirolimu je RAD (everolimus, Certican®), který má 2-3x nižší imunosupresivní aktivitu *in vitro*, ale

in vivo je srovnatelně účinný se sirolimem⁶⁶. V kombinaci s cyklosporinem A působí RAD stejně jako sirolimus synergicky, a to umožňuje použít výrazně redukovně dávky obou léků⁶⁷.

Ukázalo se, že sirolimus omezuje syntézu DNA v buňkách hladkého svalstva cév stejně tak i jejich proliferaci a migraci. Jeho antiproliferační účinky jsou dnes využívány v invazivní kardiologii v rámci řešení problému restenóz uvnitř koronárního stentu po angioplastice stenotické koronární arterie. Stenty potažené sirolimem vykazují nižší výskyt restenóz a jsou spojeny s nižším rizikem kardiovaskulárních příhod.⁶⁸ Rapamycin (sirolimus, Rapamune®) a rapamycinový analog RAD jsou v současnosti předmětem řady preklinických i klinických studií. V experimentálním modelu na velkých zvířatech bylo prokázáno, že sirolimus prodloužil přežití ledvinných prasečích aloštěpů⁶⁹. Většina studií byla ale provedena na malých hlodavcích. Sirolimus velice účinně zabránil rozvoji akutní rejekce ať již v monoterapii nebo v kombinaci s cyklosporinem⁷⁰. Navíc byla léčba sirolimem úspěšná v potlačení akcelerované rejekce⁷¹. Dlouhodobá léčba sirolimem v malých dávkách vedla k redukcí rozsahu transplantacní vaskulopatie (chronická rejekce transplantovaného srdce) laboratorního potkana⁷². V jiném modelu chronické rejekce-obliterující bronchiolitidě, která se vyvíjí po transplantaci plic, sirolimus účinně blokoval obliteraci dýchacích cest jak u aloštěpů, tak i xenoštěpů v experimentálních modelech používajících laboratorní myši a křečky^{73,74}.

Na modelu chronické rejekce transplantované ledviny u laboratorního potkana bylo zjištěno, že zvířata léčená rapamycinovým analogem měla v transplantované ledvině prokazatelně nižší leukocytární infiltraci (lymfocytů i klíčových makrofágů), nižší expresi některých adhezivních molekul a také komponent extracelulární matrix. Rovněž bylo prokázáno, že RAD snížil expresi genu klíčového růstového faktoru TGF- β .⁷⁵

Z experimentálních studií^{69,70} vyplývá několik důvodů pro použití sirolimu nebo RAD v profylaxi chronické rejekce. Tyto deriváty inhibují růstovými faktory navozenou proliferaci buněk hladkého svalstva cév. Potlačují intimální ztluštění jako následek traumatických vlivů. V experimentálních modelech chronické rejekce potlačují její projevy. Snížení počtu akutních rejekcí je předpokladem pro snížený výskyt chronické rejekce.

Na druhé straně některé z nežádoucích účinků sirolimu a RAD (hyperlipidemie) patří k aloantigen nezávislým faktorům ovlivňujícím rozvoj chronické rejekce. Nicméně doklady o příznivém ovlivnění chronické rejekce transplantovaných orgánů u člověka dosud chybějí.

V. Inhibitory cirkulace lymfocytů

FTY 720 (fingolimod)

FTY 720 (fingolimod) je malá syntetická molekula, která se strukturálně podobá antibiotiku myricinu. Toto nové imunosupresivum snižuje počet T a B buněk v periferní krvi, zatímco jejich počet v lymfatických uzlinách a v Peyerských plátech je zvýšen. Zdá se, že je tomu tak v důsledku efektu FTY 720 na adhezivní molekuly na lymfocytech. Přestože mechanismus účinku není dosud zcela objasněn, má se za to, že tento přesměrovaný buněčný „homing“ uskutečňuje FTY 720 modifikací chemokinových receptorů spjatých s G-proteiny na lymfocytech. Výsledkem je snížená lymfocytární infiltrace štěpu a prodloužená lymfopenie. Počet a funkce granulocytů nejsou ovlivněny. Tato látka může potencovat imunosupresivní efekt cyklosporinu A nebo rapamycinu. Použití molekuly FTY 720 se ukazuje jako slibné zejména při transplantacích pankreatických ostrůvků.⁵⁷

1.4.3.2.2 *Protilátky*

I. Polyklonální protilátky

Antilymfocytární globulin (ALG) a antithymocytární globulin (ATG)

Tyto protilátky se používají u orgánových transplantací k profylaxi a k léčbě rejekcí. Získávají se ze zvířat imunizovaných lidskými T-lymfocyty. K vyvolání žádoucí imunosuprese se používá antisérum nebo čištěná imunoglobulinová frakce (tj. IgG nebo gamaglobulin). Imunosupresivní účinek heterologního antilymfocytárního globulinu (ALG) a antithymocytárního globulinu (ATG) se uplatňuje mechanismem funkčního odstranění periferních lymfocytů z oběhu. Tento typ globulinů se váže na povrch T-lymfocytů v cirkulaci a vede k lymfopenii a porušení T-imunitní odezvy. Po aplikaci látky parenterální cestou může dojít v důsledku přítomnosti cizorodých proteinů k sérové nemoci a nefritidě. Dalšími toxickými symptomy bývají zimnice a horečka, leukopenie, trombocytopenie.⁵²

II. a) Monoklonální protilátky proti rozpoznávacím molekulám

Monoklonální protilátky proti CD3 povrchovému znaku lymfocytů

Tyto protilátky (muromonab-CD3; monoklonální protilátka Orthoclone OKT3) se používají k léčbě steroid-rezistentních akutních rejekcí. CD3 je typickým znakem všech zralých lymfocytů T. Funkce této molekuly spočívá v přenosu signálu z receptorů pro antigen lymfocytů T (TCR) do nitra buňky.

Anti-CD3 protilátky mají depleční účinek na všechny T lymfocyty z plazmy. Působením OKT3 dochází k vyřazení TCR a poruše rozpoznání antigenu. OKT3 také způsobuje depleci aktivovaných cytotoxických T lymfocytů. Tyto protilátky se podávají nárazově i.v. nebo v krátkodobé infuzi k léčbě rejekcí nebo i jako indukční profylaktická léčba ve sníženém dávkování. Nežádoucím účinkem této protilátky je tzv. cytokinový

syndrom, který se projevuje od mírného onemocnění až po život ohrožující cytokinovou reakci a navíc může teoreticky přispívat k další aktivaci endotelu. Další nežádoucí účinky postihují CNS (bolesti hlavy, křeče, encefalopatie, edém mozku, aseptická meningitida, aj.).⁵⁷

Monoklonální protilátky proti CD4 povrchovému znaku lymfocytů

CD4 je typickým povrchovým znakem pomocných lymfocytů T. Účastní se na prezentaci exogenních antigenů předkládaných buňkami prezentujícími antigen formou komplexu s antigeny HLA II. třídy. Poznatky o monoklonální protilátce anti-CD4 nejsou jednoznačné.⁷⁶

Monoklonální protilátky proti CD52 povrchovému znaku lymfocytů

Campath-1H (alemtuzumab), je rekombinantní humanizovaná anti-CD52 monoklonální protilátka, která má lytické účinky na celou řadu hematopoetických buněk, především na T i B buňky. Byla již užitá v léčbě chronické lymfatické leukémie, při reakci štěpu proti hostiteli a rovněž již byla experimentálně užitá při prevenci akutní rejekce po transplantacích různých orgánů. Používá se jako úvodní indukční léčba jejíž smyslem je umožnění dlouhodobé léčby s minimální udržovací imunosupresí.^{57,76}

II b) Monoklonální protilátky proti receptorům pro interleukin-2

Protilátky proti receptoru pro interleukin-2 (IL-2)

Základními dvěma druhy těchto protilátek jsou chimerická basiliximab a humanizovaná daclizumab. Basiliximab (Simulect), chimerická anti CD25 (IL-2R α) je monoklonální protilátka isotypu IgG1. Působí jako antagonist vázby IL-2 na alfa řetězec receptoru IL-2R (25). Daclizumab (Zenapax) je humanizovaná anti CD25 (IL-2R α) monoklonální protilátka isotypu IgG1. α -řetězec receptoru IL-2R neboli znak CD25 není přítomen na klidových buňkách, ale exprimuje se na T-lymfocytech aktivovaných např.

aloantigenem. Obsazení α -řetězce receptoru protilátkou znemožňuje stimulaci aktivovaného lymfocytu k proliferaci a klonální expanzi.⁷⁷ Účinek těchto protilátek je selektivně omezen na aktivované T-lymfocyty a nevede k hlubokému poklesu lymfocytů. Proto se tyto protilátky nazývají non-depleční. Jejich podání nevede k rozvoji cytokinového syndromu. Další výhodou mají v tom, že imunogenní část myšního imunoglobulinu je nahrazena lidským IgG, což redukuje tvorbu neutralizačních protilátek schopných protilátky inaktivovat. Tyto protilátky jsou podávány pouze profylakticky v časném potransplantačním období k potlačení rejekce. Oba přípravky se podávají v krátkodobé infuzi.^{78,79}

II c) Monoklonální protilátky proti adhezivním molekulám

Monoklonální protilátky proti ICAM a LFA1 povrchovým znakům lymfocytů

Monoklonální protilátky proti cytoadhezivním molekulám (např. anti-ICAM, anti-LFA1) mohou významně redukovat endoteliální poškození a následnou endoteliální aktivaci. Sníží se tak riziko akutní rejekce a následně snad i rejekce chronické.⁸⁰

II d) Monoklonální protilátky proti kostimulačním molekulám

Fúzní protein CTLA 4-Ig, anti-B7 monoklonální protilátka

Novým slibným přístupem v imunosupresivní terapii je blokáda kostimulačního signálu. V poslední době se za hlavní systém kostimulace považuje interakce mezi CD28 na povrchu T-buněk a ligandy B7 na povrchu antigen prezentujících buněk. Tuto cestu kostimulace je možno účinně blokovat fúzním proteinem CTLA 4-Ig nebo anti-B7 monoklonálními protilátkami. CTLA 4 (CD 154) je součástí koaktivačního signálu mezi antigen prezentující buňkou a T lymfocylem. CTLA 4-Ig se váže na CD80 i CD86 a tím blokuje koaktivační signál. T lymfocyty jsou sice aktivovány, ale neprojdou tzv.

restrikčním bodem a končí apoptózou. Tato blokáda tedy potlačuje imunitní odpověď a v některých případech navozuje až transplantační toleranci. V experimentálních modelech bylo prokázáno, že účinná blokáda kostimulačního signálu T-lymfocytů pomocí CTLA 4-Ig zabránila vzniku chronické rejekce ledvinných i srdečních aloštěpů.^{81,82}

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo studium transformujícího růstového faktoru β (TGF- β 1) a jeho vztahu k experimentálnímu modelu I/R poškození i ke klinické jednotce – chronické transplantační nefropatii.

Cílem první, experimentální části bylo detailní studium v literatuře dosud nepopsané schopnosti sirolimu ovlivnit změny navozené kombinací hypertenze, I/R poškození a redukcí masы nefronů. Tento model simuluje na aloantigenu nezávislé rizikové faktory nutné pro vznik chronické transplantační nefropatie v klinické transplantologii. Cílem našeho experimentu bylo dokázat na modelu I/R poškození u laboratorních potkanů s geneticky navozenou hypertenzí, že imunosupresivum sirolimus zabrání po I/R poškození rozvoji těžké proteinurie a příznivě ovlivní tíži strukturálních změn a že sníží expresi genu klíčového růstového faktoru TGF β -1.

V druhé, klinické části bylo cílem objasnit vztah obrazu chronické rejeckce v protokolárních biopsiích u pacientů po transplantaci ledviny k plazmatické hladině TGF- β 1 a fibronektinu. Současně bylo cílem sledovat změny v plazmatických hladinách TGF- β 1 a fibronektinu vzhledem k typu imunosuprese.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

I/R poškození je nejdůležitějším aloantigenně nezávislým rizikovým faktorem. Z klinických a experimentálních pozorování vyplývá, že se podílí jak na vzniku akutní rejekce tak i chronické transplantační nefropatie. V současnosti je přijímána hypotéza, že I/R poškození stojí na počátku zvýšení imunologické reaktivity organismu příjemce, což vysvětluje i pozorování častého současného výskytu epizod akutní rejekce a opožděného rozvoje funkce transplantované ledviny¹⁵. Vliv I/R na vznik chronické transplantační nefropatie je dobře dokumentován v pokusech na zvířatech.

Vycházeli jsme z experimentů, které můj školitel prováděl v minulosti na Essenské univerzitě. V těchto experimentech byl testován účinek různých imunosupresiv v experimentálním modelu chronické transplantační nefropatie, kdy jsou ledviny odebrané od potkanů kmene Fischer (F344) transplantovány příjemcům kmene Lewis (LEW). Tento model byl poprvé popsán již před 35 lety Whitem. U tohoto modelu je dárcem kmen Fischer (F334) a příjemcem Lewis (LEW). Tyto dva kmeny se minimálně liší v MHC antigenech. Proto k potlačení akutní rejekce stačí 10-ti denní léčba malou dávkou cyklosporinu A a dále pak příjemci přežívají bez imunosuprese. Progresivně však vyvíjejí proteinurii a morfologické změny, které jsou obdobou histologických nálezů u chronické transplantační nefropatie u člověka. Tilney a jeho skupina v Bostonu oživila tento model počátkem devadesátých let. Mnoho poznatků o patofyziologii chronické transplantační nefropatie pak vychází z tohoto modelu, který začaly následně používat i jiné výzkumné skupiny¹⁵. Jako klíčové pro rozvoj chronických změn se v tomto modelu považuje právě I/R poškození.

Později jsme, již v domácích podmínkách, vytvořili nový, dosud nepublikovaný model akcelerované nefropatie tím, že jsme ledviny hypertenzních potkanů s geneticky navozenou hypertenzí (Ren-2) vystavili 45 minutové studené ischemii a současně jsme provedli druhostrannou nefrektomii (*příloha 4*). Transgenní potkan (TGR) pro myši „Ren-2“ reninový gen (oficiální název kmene TGR(mREN-2)-27) představuje geneticky přesně definovaný model hypertenze spojené s renin-angiotenzinovým systémem (RAS)²⁷. Bylo experimentálně prokázáno, že aktivace RAS způsobuje progresi renální dysfunkce s proteinurií a zvětšuje rozsah strukturálních změn.^{83,84} Náš model akcelerované nefropatie je samozřejmě umělý (zvláště vyšší hypertenze), nicméně je podobný situaci známé z transplantační medicíny. To tím, že spojuje známé na aloantigenu nezávislé rizikové faktory progresu chronické transplantační nefropatie s renin-angiotenzinovým systémem. Ten hraje klíčovou úlohu v progresi chronických renálních onemocnění včetně chronické transplantační nefropatie⁸⁵. Zjevnou výhodou našeho modelu je jeho technická snadnost v porovnání s modelem transplantačním.

Naše experimenty jsme provedli jak na hypertenzních transgenních potkanech tak i na normotenzních potkanech. Normotenzní zvířata po I/R inzultu vyvinula od 12. týdne významnou proteinurii, rozdíly byly nejvyšší v 16. týdnu. Rozsah glomerulosklerózy v 16. týdnu dobře koreloval s vyšší proteinurie. V případě hypertenzních potkanů po I/R inzultu se proteinurie objevila brzy a na konci sledování bylo závažné i poškození ledvinné struktury (*příloha 4*). Normotenzní zvířata léčená imunosupresivem rapamycinem - sirolimem měla významně nižší proteinurii i rozsah glomerulosklerózy v porovnání s kontrolní skupinou. Tento nález je zcela v souladu s publikovanou literaturou⁸⁶. U hypertenzních potkanů jsme na konci experimentu žádné významné rozdíly mezi zvířaty léčenými sirolimem a placebem nepozorovali.

Zajímavé ale bylo pozorování nižší proteinurie v prvním měsíci po ischemickém infultu. Proto jsme experiment u hypertenzních potkanů opakovali. Opět jsme pozorovali snížení proteinurie, ale histologické nálezy ve skupinách léčených a neléčených byly po prvním měsíci shodné. Pozorovaná snížená exprese TGF- β 1 na endotelu cév u léčených zvířat může vysvětlit patogenezi cévního poškození (*příloha 3*).

Studie posledního desetiletí ukazují, že jak angiotenzin II tak TGF- β 1 hrají důležitou úlohu v procesu fibrogenese⁸⁷. Ví se, že těžký infult, jakým je I/R poškození může vyvolat fibrózu. Basile ve své studii demonstroval zvýšenou expresi TGF- β 1 po renálním I/R poškození. Vzhledem k tomu, že růstové faktory se podílejí na vývoji glomerulosklerozy a intersticiální fibrózy⁸⁸, měla by být terapeutickým cílem prevence fibrózy ovlivněním těchto růstových faktorů.

Je známo, že sirolimus snižuje expresi genů asociovaných s fibrózou po ischemicko/reperfuzním poškození u normotenzních zvířat. Jain et al. pozorovali u zvířat léčených sirolimem nižší proteinurii než u kontrol a vývoj proteinurie stejně tak jako pokles renálních funkcí byl v korelaci se zvýšenou expresí mRNA pro TGF- β 1⁸⁶.

V našem krátkodobém experimentu (*příloha 3*) bylo pozorováno snížení exprese TGF- β 1 pouze v intimě cév, nikoli však v ostatních renálních strukturách. Toto zjištění není překvapující u transgenních hypertenzních zvířat, která vykazují lokální nadprodukcii reninu a angiotenzinu II neboť je známo, že angiotenzin II indukuje geny pro TGF- β 1 a účastní se tak přímo i nepřímo procesu renální fibrózy.

Zjistili jsme, že léčba sirolimem v nízkých dávkách ovlivnila některé důsledky ischemicko/reperfuzního poškození u transgenních hypertenzních potkanů s vysokou produkcí reninu. Statisticky nevýznamně snížila rozsah proteinurie a glomerulosklerozy a významně snížila expresi TGF- β 1 v intimě cév. Naše pozorování je tak ve shodě

s hypotézou, že léčba sirolimem příznivě ovlivní chronickou vaskulopatii transplantované ledviny (*příloha 3*).

V dlouhodobé studii jsme dále zjistili, že geneticky navozená hypertenze významně akceleruje chronické změny v renálním parenchymu po I/R poškození jedné ledviny (*příloha 4*).

3.2 KLINICKÁ ČÁST

3.2.1 Naše první zkušenosti s protokolární biopsií transplantovaných ledvin

Na Klinice nefrologie Transplantačního centra IKEM v Praze byla provedena dlouhodobá studie s protokolárními biopsiemi transplantovaných ledvin. Cílem protokolární biopsie štěpu bylo zjistit především výskyt chronické transplantační nefropatie (CTN) a jejích vztahů ke klinickým a laboratorním ukazatelům.

3.2.1.1 Soubor nemocných a použité metody

Biopsie byly provedeny u 105 nemocných 1 rok po transplantaci ledviny ze zemřelého nebo živého dárce se stabilizovanou funkcí transplantované ledviny na úrovni sérového kreatininu do 280 $\mu\text{mol/l}$. Demografická charakteristika souboru je uvedena v tabulce č.1. Nemocní byli léčeni trojkombinací imunosupresiv. Základními léky byly cyklosporin A (Cs-A) nebo tacrolimus (TAC). Dalšími součástmi režimu byly prednison a/nebo azathioprin/mykofenolát mofetil a /nebo sirolimus/everolimus.

Protokolární biopsie byly prováděny z konvexity štěpu jehlou o síle 16 Gauge po sonografickém zaměření. Bioptické vzorky byly hodnoceny histomorfologicky podle kritérií Banffské 97' klasifikace³⁵ s cílem zhodnotit stupeň chronické transplantační nefropatie (CTN): normální nález = 0, míra postižení CTN = stupeň I.-III. a porovnat bioptický nález s klinickými a laboratorními daty.

3.2.1.2 Klinická a laboratorní data

V době biopsie byly zaznamenány základní klinické a laboratorní údaje: věk, pohlaví, základní onemocnění, body mass index (BMI), počet neshod mezi dárce a příjemcem v HLA, maximální protilátky proti panelu (PRA), krevní tlak systolický (TKs) a

diastolický (TKd), sérový kreatinin (S-kr), glomerulární filtrace vypočtená z clearance kreatininu (Cl-kr), ztráty bílkovin močí/24 hod. (PU), plazmatický cholesterol a triglyceridy, počet užívaných antihypertenziv, hypolipidemik, věk dárce ledviny a počet prodělaných akutních rejekcí před biopsií. Nemocní byli znovu vyšetřeni za 1 rok po provedené biopsii (za 2 roky po transplantaci).

Součástí naší studie byla i analýza některých imunologických rizikových faktorů ovlivňujících vznik chronické transplantační nefropatie. Podílela jsem se na této části studie stanovením a hodnocením plazmatických hladin TGF- β 1, fibronektinu a exprese TGF- β 1 ve štěpu.

	N	Korelace s morfologií
Soubor s provedenou protokolární biopsií	105	
M/Ž	73/32	
Průměrný věk	50,54±12,45	*
Základní onemocnění glomerulonefritis	35 (32%)	
Tubulointersticiální nefritis	23 (22%)	
Polycystické ledviny a hereditární nefropatie	20 (19%)	
Neznámé a jiné příčiny selhání ledvin	19 (18%)	
Prům. počet neshod v HLA (A+B+DR)	3,3±1	NS
Protilátky proti panelu (PRA) [%]	18,9±22,2	NS
PRA <50% / >50%	96/9	
Kadaverózní / živý dárce	94/11	

Tab. č. 1 Demografická data

Výše uvedená studie představuje základní soubor pacientů, klinických a laboratorních dat (*příloha 5*). Z tohoto souboru jsme pak dále vycházeli v následujících dílčích studiích.

3.2.2 Plazmatické hladiny TGF- β 1, exprese TGF- β 1 ve štěpu a chronická transplantační nefropatie v protokolárních biopsiích ledvin

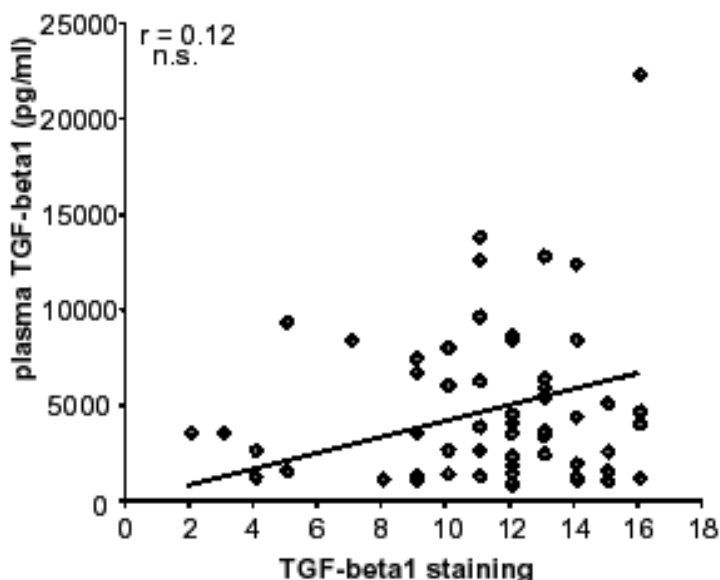
V této části jsme se zaměřili pouze na skupinu pacientů (n=67) kteří dostávali imunosupresi založenou na cyklosporinu A (s cílovou hladinou 150-250 ng/ml) v kombinaci s antiproliferativní látkou mykofenolátem mofetilem nebo derivátem rapamycinu a steroidy.

Cílem studie byla analýza obrazu chronické rejekce v protokolárních biopsiích u pacientů 1 rok po transplantaci ledviny, hodnocení plazmatických hladin TGF- β 1 a exprese TGF- β 1 ve štěpu.

Protokolární biopsie byly prováděny v 1 roce po transplantaci. Biopsické vzorky byly hodnoceny histomorfologicky podle kritérií Banffské 97' klasifikace³⁵ s cílem zhodnotit stupeň chronické transplantační nefropatie (CTN): normální nález = 0, míra postižení CTN = stupeň I.-III. a porovnat biopsický nález s klinickými a laboratorními daty. Vzorky byly rovněž analyzovány imunohistologicky k průkazu TGF- β 1. Jako primární protilátka byla použita anti-human TGF- β 1 protilátka (Biosource Int, CA, USA).

Klinické a laboratorní údaje byly zaznamenány v době biopsie. Získaná klinická a histomorfologická data byla dávana do souvislostí s imunohistologickými daty a plazmatickými hladinami TGF- β 1. Plazmatické hladiny TGF- β 1 byly stanovovány metodou ELISA. Krevní odběr byl u pacientů prováděn v den biopsie.

Přestože zde byl patrný nesignifikantní trend k vyšším plazmatickým koncentracím TGF- β 1 u pacientů s větší expresí TGF- β 1 ve štěpu (graf č.1), nenašli jsme jednoznačný vztah mezi plazmatickými hladinami TGF- β 1 a funkcí štěpu, stupněm CTN, chronické vaskulopatie ani cílovou hladinou cyklosporinu A. V této studii však byl nalezen signifikantní vztah mezi expresí TGF- β 1 ve štěpu a chronickou vaskulopatií ($p < 0,01$). Zdá se tedy, že tkáňová exprese TGF- β 1 koreluje mnohem více s chronickou transplantační vaskulopatií než se stupněm chronické transplantační nefropatie (*příloha 6*).



Graf č. 1 Vztah plazmatických koncentrací TGF- β 1 a exprese TGF- β 1 ve štěpu.

3.2.3 Plazmatické hladiny fibronektinu u pacientů 1 rok po transplantaci ledviny

V této nepublikované studii jsme opět vycházeli z našeho základního souboru pacientů. Cílem bylo stanovení plazmatické hladiny fibronektinu ze vzorků krve (EDTA-plazma) od transplantovaných pacientů za účelem zjištění vztahu plazmatické hladiny fibronektinu ke stupni chronické transplantační nefropatie (CTN) a dalším laboratorním parametrům.

Metodika a soubor pacientů

Do studie bylo zahrnuto 94 transplantovaných pacientů u kterých byla prováděna protokolární biopsie v 1 roce po transplantaci ledviny a 13 zdravých dobrovolníků. Součástí bylo i porovnávání dvou skupin pacientů léčených trojkombinací imunosupresiv, jejíž součástí byl cyklosporin A (Cs-A, n=43) nebo tacrolimus (TAC, n=25). Odběry byly u pacientů provedeny jednorázově, v den biopsie. Dále pak u kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků. Fibronektin byl stanovován turbidimetricky na analyzátoru Cobas Mira s použitím reagensů firmy Dako.

Výsledky

Bylo zjištěno, že rozdíl plazmatické hladiny fibronektinu mezi oběma sledovanými skupinami (pacienti, n=94; kontrolní skupina, n=13) není statisticky signifikantní ($0,28 \pm 0,09$ g/l vs $0,31 \pm 0,17$ g/l; n.s. $p < 0,05$), a že vztahy plazmatické hladiny fibronektinu k stupni chronické transplantační nefropatie (CTN), cévním změnám, expresi TGF- β 1 a k plazmatickým hladinám TGF- β 1 byly rovněž bez statistické významnosti. Rovněž při porovnání dvou skupin pacientů léčených trojkombinací imunosupresiv, jejíž součástí byl cyklosporin A (Cs-A, n=43) nebo tacrolimus (TAC, n=25) nebyl rozdíl hladiny fibronektinu v plazmě statisticky významný (Cs-A $0,29 \pm 0,13$ g/l vs TAC $0,36 \pm 0,24$ g/l; n.s. $p < 0,05$).

Diskuze a závěr

Z výsledků usuzujeme, že fibronektin je nespecifický marker při monitorování pacientů v jednom roce po transplantaci ledviny. Avšak dynamické monitorování v krátké době po transplantaci by mohlo mít význam při odhadu post-transplantačních komplikací (akutní rejeckce, akutní tubulární nekrózy a infekcí) a prognózy výsledku transplantace⁸⁹.

3.2.4 Efekt různých imunosupresivních režimů na plazmatickou hladinu TGF- β 1 a expresi TGF- β 1 u pacientů po transplantaci ledvin

Do této studie bylo zahrnuto 79 pacientů, kteří byli léčeni trojkombinací imunosupresiv, jejíž součástí byl cyklosporin A (Cs-A, n=49) nebo tacrolimus (TAC, n=30). Cílem bylo porovnat vliv různých imunosupresivních režimů na expresi TGF- β 1 a na plazmatickou hladinu TGF- β 1.

Bioptické vzorky byly opět hodnoceny histomorfologicky podle kritérií Banffské 97' klasifikace, imunohistologicky k průkazu TGF- β 1 a z krevního odběru v den biopsie byly stanovovány plazmatické hladiny TGF- β 1. TGF- β 1 exprese byla analyzována s použitím primární protilátky anti-human TGF- β 1 protilátka (Biosource Int, CA, USA) a hodnocena semikvantitativně v různých renálních strukturách. Klinická a laboratorní data (včetně plazmatických hladin TGF- β 1) byla u pacientů zaznamenána jednak v době protokolární biopsie (tj. 12 měsíců po transplantaci) a dále za 1 rok po provedené biopsii (tj. 24 měsíců po transplantaci).

Zjistili jsme, že koncentrace TGF- β 1 v plazmě byly u tacrolimové skupiny signifikantně vyšší než u skupiny léčené cyklosporinem A (7206 ± 4799 vs. 5366 ± 4427 pg/ml), $p < 0,05$). Po 12 měsících sledování tyto hodnoty ještě signifikantně vzrostly u tacrolimu na 12613 ± 5672 pg/ml ($p < 0,001$) a cyklosporinu A na 9275 ± 4427 pg/ml ($p < 0,05$). Nenalezli jsme žádné korelace s klinickými nebo laboratorními daty. Zjistili jsme však, že exprese TGF- β 1 ve štěpu byla naopak nižší u pacientů léčených tacrolimem v porovnání s cyklosporinovou skupinou ($5,0 \pm 3,2$ vs. $9,9 \pm 4,1$ $p < 0,001$).⁹⁰ Toto naše zjištění bylo publikováno (*příloha 7*) a je ve shodě s obdobným nálezem u pacientů po transplantaci ledviny^{91,92}.

Dále bylo zjištěno, že pacienti kteří byli léčeni tacrolimem měli v době biopsie (tj. 12 měsíců po transplantaci) signifikantně nižší diastolický krevní tlak a hodnoty sérového

cholesterolu v porovnání s cyklosporinovou skupinou. V době biopsie se funkce štěpu v obou sledovaných skupinách významně nelišila, avšak za 1 rok po provedené biopsii (tj. 24 měsíců po transplantaci) došlo k signifikantnímu poklesu glomerulární filtrace u cyklosporinové skupiny zatímco u tacrolimové zůstala nezměněna.

Z našeho pozorování signifikantně nižší exprese TGF- β 1 v protokolárních biopsiích ledvin v 1 roce po transplantaci u pacientů léčených tacrolimem se stabilní funkcí štěpu a rozdílného vývoje funkce štěpu v obou skupinách usuzujeme na možný příznivý vliv imunosupresiva tacrolimu na dlouhodobé přežívání štěpu.

3.2.5 Imunosuprese zvyšuje plazmatické hladiny TGF- β 1 u pacientů po transplantaci ledvin

V této nepublikované studii jsme analyzovali plazmatické hladiny TGF- β 1 u pacientů s různými imunosupresivními režimy po transplantaci ledviny a dále u skupiny netransplantovaných pacientů (tj. bez imunosuprese) s chronickou renální insuficiencí (CHRI). Skupina transplantovaných pacientů je opět součástí našeho základního souboru pacientů (viz. 3.2.1).

Metodika a soubor pacientů

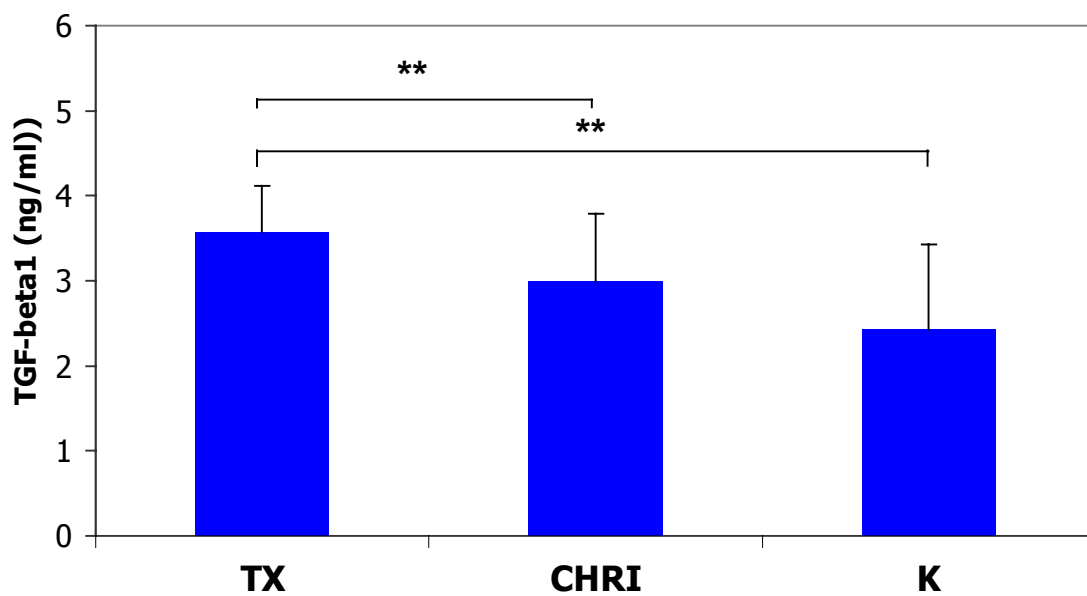
Do studie bylo zahrnuto 97 pacientů se stabilní funkcí štěpu (úroveň sérového kreatininu do 280 μ mol/l) 12 měsíců po transplantaci ledviny (skupina I), 58 pacientů s chronickou renální insuficiencí (tj. bez imunosuprese, skupina II) a 14 zdravých dobrovolníků (skupina III). Příjemci ledvinného štěpu, kteří byli léčeni trojkombinací imunosupresiv, kde základním imunosupresivem byl buď cyklosporin, tacrolimus nebo everolimus, byli dále rozděleni dle typu imunosuprese do tří skupin (A, B, C).

- I. Skupina pacientů po transplantaci ledviny (n=97), (TX); imunosupresivní režimy:
 - A/ cyklosporin + mykofenolát mofetil + steroidy (n=55), (Cs-A)
 - B/ tacrolimus + mykofenolát mofetil + steroidy (n=29), (TAC)
 - C/ everolimus + cyklosporin + steroidy (n=13), (RAD)
- II. Skupina pacientů s chronickou renální insuficiencí (n=58), (CHRI)
- III. Kontrolní skupina zdravých dobrovolníků (n=14), (K)

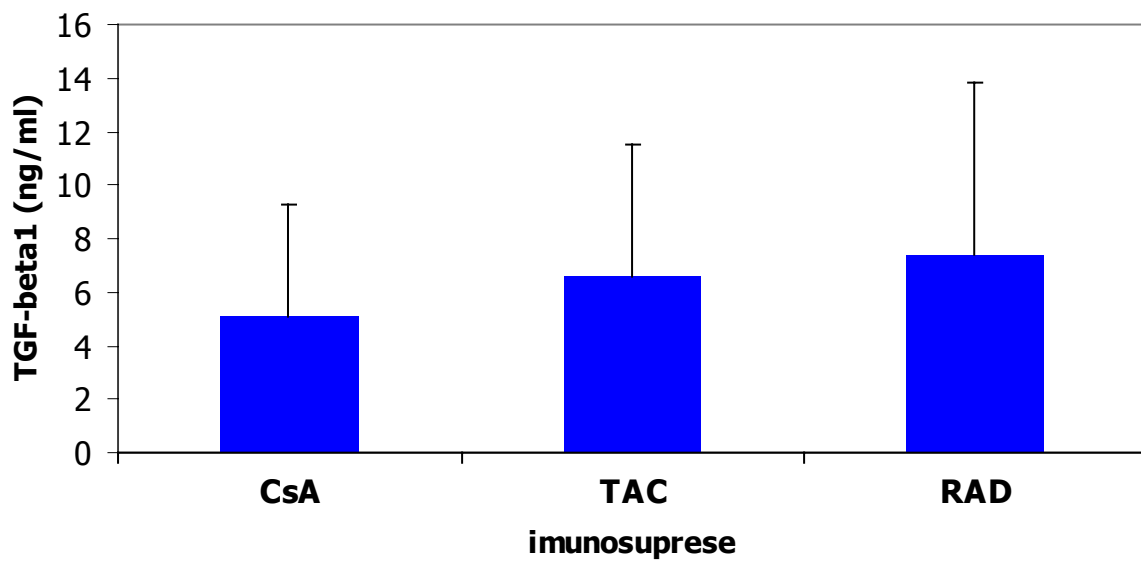
U skupiny 58 netransplantovaných pacientů (tj. bez imunosuprese) se chronická renální insuficience vyvinula na podkladě těchto diagnóz: diabetická nefropatie, chronické glomerulonefritidy (IgA nefropatie, fokálně segmentální glomeruloskleróza), polycystické ledviny, vaskulární nefroskleróza, tubulointersticiální nefritida, Alportův syndrom a nejasné v.s. analgetické nefropatie.

Výsledky

Zjistili jsme, že skupina transplantovaných (n=97) měla signifikantně vyšší plazmatickou hladinu TGF- β 1 ve srovnání se skupinou pacientů s chronickou renální insuficiencí resp. se zdravými kontrolami ($3,57 \pm 0,55$ vs $2,99 \pm 1,20$ ng/ml; $p < 0,01$ a $3,57 \pm 0,55$ vs $2,43 \pm 1,13$ ng/ml; $p < 0,01$) - graf č.2. Nepozorovali jsme žádné rozdíly v plazmatických hladinách TGF- β 1 mezi pacienty s CHRI a kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků. Také jsme nenalezli žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami pacientů s různými imunosupresivními režimy (Cs-A: $5,10 \pm 4,14$; TAC: $6,56 \pm 4,96$ a RAD: $7,38 \pm 6,48$ ng/ml; Kruskal-Wallis test: n.s.) - graf č.3. Renální funkce transplantovaných pacientů a pacientů s CHRI se nijak významně nelišily ($1,10 \pm 0,43$ vs $0,81 \pm 0,59$ ml/s; n.s.).⁹³



Graf č. 2 Plazmatické hladiny TGF- β 1 u pacientů po transplantaci ledviny (TX), pacientů s chronickou renální insuficiencí (CHRI) a u kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků (K).



Graf č. 3 Plazmatické hladiny TGF- β 1 u pacientů s různými imunosupresivními režimy.

Diskuze a závěr

Námi pozorovaný vzestup plazmatických hladin TGF- β 1 u transplantovaných pacientů odráží nejspíše systémovou imunosupresi a nemusí být spojen s chronickou renální insuficiencí. Přestože je zde patrný trend, nepozorovali jsme významnou asociaci plazmatických hladin TGF- β 1 v závislosti na typu imunosuprese. Naše pozorování je tak v souladu se studií, ve které jsou popisovány vyšší hladiny TGF- β 1 u nemocných s transplantovanou ledvinou ve srovnání se zdravými nebo nemocnými s glomerulonefritidou⁹⁴. Jiná studie však popisuje normální hladiny TGF- β 1 jak u kontrol, tak u transplantovaných pacientů a naopak vyšší hladiny TGF- β 1 jen u některých ledvinných onemocnění spojených s chronickou renální insuficiencí a nutností dialyzační léčby⁹⁵.

3.2.6 Diskuze ke stanovení a hodnocení plazmatické hladiny TGF- β 1

Je známo, že TGF- β 1 stimuluje proces fibrogenese regulací buněčného růstu a diferenciace, indukci tvorby extracelulární matrix a ovlivňuje tak mechanismus reparace tkáně jako klíčový profibrogenní cytokin spojený s patogenezi chronické transplantační nefropatie. Bylo zjištěno, že vysoké plazmatické hladiny TGF- β 1 mohou mít vliv na renální fibrózu a ztrátu funkce štěpu.⁸ Do patogeneze fibrózy mohou zasahovat i některé léky jako například cyklosporin A, který je u orgánových transplantací používán již řadu let jako základní imunosupresivum. Jedním z pozdních projevů jeho nefrotoxicity je i fibrotizace ledvinného intersticia v důsledku zvýšené produkce TGF- β .⁹⁶ Intersticiální fibróza, vzniklá na podkladě nefrotoxicity, je nespecifický jev a může se podobat fibróze provázející chronickou transplantační nefropatii. Zdá se tedy, že tento růstový faktor hraje

roli v procesu renální fibrózy v asociaci s podáváním cyklosporinu a také pravděpodobně zvyšuje imunosupresivní efekt tohoto léku.

Ledviny jsou orgánem, kde fibróza koreluje s vývojem do konečného selhání. Příkladem fibrotizujícího onemocnění je diabetická nefropatie, při níž je v ledvinách zvýšená exprese TGF- β . Zvyšuje extracelulární matrix v glomerulech i mezi tubuly. Zvýšená exprese TGF- β byla nalézána u různých forem chronických glomerulonefritid, například u IgA nefropatie a segmentální glomerulosklerózy, kde korelovala se stupněm fibrózy.³

K určování koncentrací TGF- β 1 se používají metody typu ELISA. Rozporuplné údaje v literatuře týkající se jak normálních hladin TGF- β 1, tak hladin indukovaných různými léky či chronickými onemocněními jdou částečně na vrub problematického a ne zcela jednotného stanovování tohoto cytokinu a s tím souvisejících rozdílů v interpretaci výsledků. Faktorů ovlivňujících výsledky dosud prováděných studií je hned několik. Rozdíl je již při výběru vzorku (sérum nebo plazma) pro stanovení tohoto cytokinu. Sérum se nezdá být nejvhodnější variantou a to z důvodu vysokého obsahu TGF- β 1 uměle uvolněného z krevních destiček (až 95% sérového TGF- β 1). Ovšem ani při stanovování z plazmy se nevyhneme měření TGF- β 1 uvolněného z destiček.⁹⁷ Jak známo, TGF- β 1 byl původně izolován právě z destiček⁹⁸, kde je skladován ve vysokých koncentracích ve formě latentního komplexu. A zde narážíme na další rozdíly v rámci určování hladin TGF- β 1 v různých studiích. Detekce celého komplexu latentní molekuly TGF- β 1 (měřeného po aktivaci a často označovaného jako celkový TGF- β 1) a nikoli pouze jeho aktivní formy je příčinou dalších rozporů mezi zjišťovanými hladinami a biologickými účinky TGF- β 1. Hughes a kol. uvádějí, že aktivní forma TGF- β 1 představuje jen asi 1% z celkové plazmatické koncentrace TGF- β 1⁹⁹. Ve snaze ovlivnit některé z těchto faktorů bylo navrženo několik postupů.

Předně se zdá být důležité minimalizovat uvolnění TGF- β 1 z destiček, ke kterému dochází ve velké míře při standardním krevním odběru za použití turniketu a vacutainerového setu (dochází k poškození destiček). Při porovnávání s tzv. „atraumatickým odběrem“ byly zjištěny významné rozdíly ve stanovené hladině tohoto cytokinu.⁹⁷ Markerem pro detekci TGF- β 1 uvolněného z destiček je β -tromboglobulin (β TG), protein uvolňovaný při degranulaci destiček. Opět byly zjištěny významné rozdíly ve stanovené hladině TGF- β 1 v případě, že tato byla korelována se stupněm aktivace destiček (množství uvolněného β TG). Z tohoto poznání vyplývají další skutečnosti, které je nutno brát v úvahu a to hlavně při studiu vlivu různých imunopresiv na hladinu TGF- β 1. Vyšlo totiž najevo, že cyklosporin A, který na rozdíl od tacrolimu podporuje aktivaci destiček a tudíž i zvyšuje množství plazmatického TGF- β 1 (po jeho uvolnění z destiček) tedy zřejmě nestimuluje přímo *in vivo* expresi TGF- β 1, ale pouze zvyšuje aktivitu destiček.⁹⁷

Pro zhodnocení aktivity TGF- β 1 tak neexistuje pravděpodobně dosud žádná metoda, kterou by bylo možno označit za zlatý standard¹⁰⁰. Tomu také odpovídají rozdílné výsledky dosud provedených studií týkajících se hladin TGF- β 1. Hughes a kol. ve své práci porovnávali cirkulující hladiny TGF- β 1 (jak sérové tak plazmatické, měřili aktivní i celkový TGF- β 1 včetně plazmatické hladiny β TG) u pacientů po transplantaci jater léčených terapeutickými hladinami cyklosporinu A nebo tacrolimu a zjistili, že ani tacrolimus ani cyklosporin A neidukují přímo hladinu aktivního TGF- β ⁹⁹. Jejich výsledek se však liší od jiných studií, ve kterých byly nalezeny vyšší hladiny celkového TGF- β 1 u pacientů s ledvinným onemocněním, kteří byli léčeni cyklosporinem A¹⁰¹, stejně tak je popisována korelace mezi hladinami cyklosporinu A a celkovým TGF- β 1 u příjemců plicních štěpů¹⁰².

Pro validní interpretaci se však zdá být nejdůležitější a zásadní používání korekčního faktoru β TG (dle naměřené plazmatické hladiny tohoto proteinu) jako nepřímého markeru aktivace destiček. Plazmatická hladina β -tromboglobulinu nás totiž nepřímo informuje o kontaminaci vzorku TGF- β 1 uvolněným z destiček.⁹⁷

Naše dlouhodobá studie uvedená v kapitole 3.2.1 byla zahájena v době, kdy nebyly ještě známy všechny tyto skutečnosti. Během studie by nebylo žádoucí jakýmkoli způsobem měnit již zavedenou metodiku. Naše výsledky považujeme za porovnatelné v rámci této studie vzhledem k tomu, že všechny odběry i laboratorní stanovení bylo prováděno dle zavedeného protokolu, za stále stejných podmínek.

Při porovnávání koncentrací TGF- β 1 a funkce ledvinného štěpu jsme nenalezli žádnou korelaci, což není zcela překvapující, neboť ani v jiné studii nebyla tato korelace nalezena⁹⁴. Zjistili jsme pouze nesignifikantní trend k vyšším plazmatickým koncentracím TGF- β 1 u pacientů s větší expresí TGF- β 1 ve štěpu (viz. 3.2.2).

V současné době je již známo poměrně mnoho o zdrojích i mechanismech účinku TGF- β , stejně tak jako i o jeho tvorbě, která je řízena geneticky. Ví se, že populace příjemců se dělí podle reakce na imunitní inzulty na vysoké a nízké reaktory (respondery). Byly popsány varianty genového polymorfizmu pro některé cytokiny včetně TGF- β . Podle fenotypu daného jedince se tak dají určit „low“ a „high“ respondeři, kteří mají odlišnou míru produkce těchto cytokinů.¹⁰³ Zvýšená produkce TGF- β zřejmě predisponuje své nositele ke zvýšené fibrogenezi¹⁰⁴. V poslední době byla provedena řada studií vyšetřujících vliv polymorfizmu genu pro TGF- β na osud transplantovaného orgánu. Většina sdělení potvrdila hypotézu, že příjemci transplantátu s vysokou produkcí TGF- β jsou ve větším riziku vzniku chronické rejekce.¹⁰⁵

Tyto znalosti mají závažné klinické konsekvence. Lze totiž modifikovat imunosupresivní režimy podle výše rizika rejekce transplantovaného orgánu. V klinické praxi se však zatím tyto poznatky běžně nepoužívají. Stejně tak ani stanovování TGF- β není dosud zavedenou klinickou metodou, přestože jsou již známy některé klinické korelace a je možno jej detekovat jak ve tkáních, tak i v periferní krvi.

4. ZÁVĚRY

4.1 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Na modelu akcelerované nefropatie u transgenních hypertenzních potkanů TGR (mREN-2)-27 jsme v dlouhodobé studii zjistili, že geneticky navozená hypertenze významně akceleruje chronické změny v renálním parenchymu po ischemicko/reperfuzním (I/R) poškození jedné ledviny .
2. Při hodnocení vlivu imunosupresiva sirolimu na hypertenzní transgenní potkany i na jejich normotenzní kontroly jsme zjistili, že u hypertenzních potkanů po I/R poškození sirolimus rozsah strukturálních změn zásadně neovlivnil. V případě normotenzních zvířat jsme však pozorovali významně nižší proteinurii (parametr, který je těsně spjatý s renálním strukturálním poškozením) i rozsah glomerulosklerózy v porovnání s kontrolní skupinou.
3. Dále jsme zjistili, že léčba sirolimem ovlivnila některé důsledky ischemicko/reperfuzního poškození u transgenních hypertenzních potkanů s vysokou produkcí reninu. Statisticky významně snížila expresi TGF- β 1 v intimě cév. Zdá se tedy, že sirolimus příznivě ovlivňuje chronickou vaskulopatii transplantované ledviny.

4.2 KLINICKÁ ČÁST

1. Analýza našich výzkumně prováděných prokolárních biopsií ledvin 1 rok po transplantaci prokázala pozitivní korelace mezi expresí TGF- β 1 ve štěpu a chronickou

vaskulopatií. Tkáňová exprese TGF- β 1 tedy koreluje mnohem více s chronickou transplantační vaskulopatií než se stupněm chronické transplantační nefropatie (CTN).

2. Mezi plazmatickými hladinami TGF- β 1 a funkcí štěpu, stupněm chronické transplantační nefropatie (CTN), chronické vaskulopatie ani cílovou hladinou cyklosporinu A jednoznačný vztah nalezen nebyl.
3. Vztahy plazmatické hladiny fibronektinu ke stupni chronické transplantační nefropatie (CTN), cévním změnám, expresi TGF- β 1 a k plazmatickým hladinám TGF- β 1 byly rovněž bez statistické významnosti.
4. Při sledování dvou skupin pacientů léčených rozdílnou trojkombinací imunosupresiv byla u skupiny pacientů léčených tacrolimem zjištěna signifikantně nižší exprese TGF- β 1 v protokolárních biopsiích a zároveň příznivější vývoj funkce štěpu oproti cyklosporinové skupině. Z toho je možné usuzovat na příznivý vliv imunosupresiva tacrolimu na dlouhodobé přežívání štěpu.
5. Při analýze plazmatických hladin TGF- β 1 u pacientů po transplantaci ledviny s různými imunosupresivními režimy oproti skupině netransplantovaných pacientů s chronickou renální insuficiencí byl zjištěn vzestup plazmatických hladin TGF- β 1 u transplantovaných pacientů. Zdá se tedy, že vzestup plazmatických hladin TGF- β 1 nemusí být spojen s chronickou renální insuficiencí a je nejspíše odrazem systémové imununosuprese. Významná závislost plazmatických hladin TGF- β 1 na typu imununosuprese však prokázána nebyla.

5. SEZNAM VLASTNÍ LITERATURY AUTORA

PUBLIKACE

1. **Böhmová R**, Viklický O. Renal ischemia–reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome. *Folia Microbiol* 2001; 46(4): 267-76.
2. **Böhmová R**, Honsová E, Heemann U, Mandys V, Lodererová A, Matl I, Viklický O. Effect of sirolimus on ischemia/reperfusion injury in transgenic hypertensive rat. *Transplant Proc* 2002; 34(8): 3051-2.
3. Viklický O, **Böhmová R**, Heemann U. Ledviny, stárnutí a transplantace. *Čas lék čes* 2002; 141/24: 765-8.
4. Viklický O, Matl I, Voska L, **Böhmová R**, Jarešová M, Lácha L, Lodererová A, Stříž I, Teplan V, Vítko Š. TGF- β 1 expression and chronic allograft nephropathy in protocol kidney graft biopsy. *Physiol Res* 2003; 52: 353-60.
5. Viklický O, **Böhmová R**, Ouyang N, Honsová E, Lodererová A, Mandys V, Vítko S, Lutz J, Heemann U. Effect of sirolimus on renal ischaemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats. *Transpl Int* 2004;17(8): 432-41.
6. Zoet YM, Eijssink C, **Böhmová R**, Witvliet MD, Kardol MJ, Franke ME, Claas FH, Mulder A, Doxiadis IL. Single-antigen-expressing cell lines are excellent tools for detecting human leukocyte antigen-C-reactive antibodies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2005; 79(9):1268-72.
7. Stříž I, Krásná E, Honsová E, Lácha J, Petříčková K, Jarešová M, Lodererová A, **Böhmová R**, Valhová S, Slavčev A, Vítko S. Interleukin 18 (IL-18) upregulation in acute rejection of kidney allograft. *Immunol Lett* 2005; 99(1):30-5.
8. Jarešová M, Petříčková K, Korčáková L, **Böhmová R**, Puchmajerová J, Zazula R, Stříž I, Totušek P, Hložánek I. *Legionella pneumophila* airway colonisation in patients admitted to hospital. *Indoor Built Environ* 2003; 12: 25-9.

PŘEDNÁŠKY, ABSTRAKTA

9. Böhmová R, Stříž I, Matl I, Viklický O. Immunosuppression increases the TGF- β 1 plasma levels in kidney transplant recipients. *New trends in Immunosuppression, Salzburg* 2004, 5-8.2.2004. Abstracts: p148.
10. Matl I, Viklický O, Voska L, Lodererová A, Stříž I, Böhmová R, Vítko S. The effect of different immunosuppressive regimen on TGF- β 1 expression in kidney transplant patients. 11th congress of the European Society for Organ Transplantation, Abstracts p.103. 2003.
11. Viklický O, Böhmová R, Honsová E, Lodererová A, Ouyang N, Heemann U, Vítko Š. Hypertension upregulates TGF- β 1 expression in renal tissue after ischemia/reperfusion injury. *Kidney Blood Press Res* 2003; 26: 209.

12. Viklický O, Matl I, Voska L, Lodererová A, Böhmová R, Stříž I, Vítko Š. TGF- β 1 expression in protocol biopsy after renal transplantation: The effect of different immunosuppressants. *Am J Transplant* 2003; 3(Suppl 5): 309.
13. Viklický O, Böhmová R, Honsová E, Rajnoch J, Mandys V, Heemann UW, Vítko Š. Tacrolimus ameliorates renal ischemia/reperfusion injury in hypertensive transgenic mREN-2 rats. *Am J Transplant* 2003; 3(Suppl 5): 467.
14. Viklický O, Böhmová R, Rajnoch J, Ouyang N, Honsová E, Vítko Š, Teplan V, Heemann UW. Tacrolimus ameliorates renal ischemia/reperfusion injury in hypertensive transgenic mREN-2 rats. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(Suppl 4): 320.
15. Viklický O, Böhmová R, Heemann U, Ouyang N, Mandys V, Vítko Š. Sirolimus ameliorates late consequences of renal ischemic injury in rat. Abstrakts: p.44 New trends in clinical and experimental immunosuppression, Geneve 2002.
16. Viklický O, Böhmová R, Heemann U et al. mTOR inhibition and renal ischemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rat. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(Suppl 1): 53-54.
17. Viklický O, Böhmová R, Honsová E, Lodenová A, Ouynag N, Hermann U, Vítko Š. Hypertense potencuje expresi TGF- β 1 v ledvinné tkáni po ischemicko/reperfusním poškození. *Aktuality v nefrologii* 2002; 8(Suppl 1): 48-49.
18. Matl I, Viklický O, Voska L, Böhmová R, Jarešová M, Lácha J, Lánská V, Lodererová A, Stříž I, Teplan V, Vítko Š. Protokolární biopsie 1 rok po transplantaci ledviny. 29. Český nefrologický kongres s mezinárodní účastí v Liberci. *Aktuality v nefrologii-Suppl 1/2002 abstrakt str. 33.*
19. Böhmová R, Jarešová M, Zazula R, Stříž I. Stanovení sérové hladiny procalcitoninu u orgánových transplantací. *Imunologický zpravodaj* 2002; roč. 31, č.2.
20. Viklický O, Matl I, Voska L, Böhmová R, Lodererová A, Stříž I, Teplan V. TGF- β 1 ve štěpu a v plazmě u nemocných po transplantaci ledviny: závislost na typu imunoprese. *Symposium FONS 2002 Klinické biochemie, Pardubice.*
21. Böhmová R, Honsová E, Heemann UW, Lodererová A, Matl I, Viklický O. Krátkodobá léčba rapamycinem u transgenních hypertensních potkanů po renálním ischemickém poškození. *Sborník abstrakt V. konference Transplantace orgánů a tkání. Brno 2002.*
22. Stříž I, Jarešová M, Lácha J, Krásná E, Kronosová B, Böhmová R, Slavčev A, Vítko Š. Interleukin 18(IL-18) u transplantací ledvin. *Abstrakt str. 62. Sborník abstrakt V. konference Transplantace orgánů a tkání. Brno 2002.*
23. Viklický O, Böhmová R, Honsová E, Lodererová A, Mandys V, Vítko Š, Heemann UW. Rapamycin omezuje následky ischemicko/reperfusního poškození ledviny v experimentálním modelu. *Abstrakt str.59. Sborník abstrakt V. konference Transplantace orgánů a tkání. Brno 2002.*
24. Matl I, Viklický O, Voska L, Lodererová A, Böhmová R, Stříž I, Teplan V, Vítko Š. Nižší exprese TGF- β 1 v protokolární biopsii 1 rok po transplantaci ledviny u nemocných léčených tacrolimem. *Abstrakt str. 16. Sborník abstrakt V. konference Transplantace orgánů a tkání. Brno 2002.*

25. Viklický O, Matl I, Voska L, Stříž I, Lodererová A, Hubáček JA, Lácha J, Teplan V, Böhmová R a Vítko Š. TGF- β and chronic rejection in protocol kidney graft biopsy. p30 10th Congress of the European Society for Organ Transplantation, Lisboa 2001.
26. Viklický O, Böhmová R, Hermann UW, Ouyang N, Mandy V, Vítko Š. Rapamycin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury in rat. p190-191. 2nd International Congress on Immunosuppression, San Diego 2001.
27. Jarešová M, Zazula R, Průcha M, Spálený A, Lázsiková E, Böhmová R, Stříž I. Vliv transplantčního výkonu na sérové hladiny PCT. XVIII. sjezd Slovenské a České společnosti alergologie a klinické imunologie s mezinárodní účastí, 2001.
28. Jarešová M, Zazula R, Průcha M, Spálený A, Lázsiková E, Böhmová R, Stříž I. Procalcitonin serum levels in patients after liver, pancreas and simultaneous kidney-pancreas transplantations. 32nd Annual Meeting of the German Society of Immunology in Dresden 2001.
29. Böhmová R, Jarešová M, Zazula R, Stříž I. Konference České imunologické společnosti, Velké Karlovice 2001: Stanovení sérové hladiny procalcitoninu u orgánových transplantací.
30. Böhmová R. Podzimní seminář České transplantologické společnosti, IKEM, Praha 2001: Metoda ELISA a její uplatnění při stanovování cytokinů.

6. LITERATURA

- 1 William F. Ganong. Přehled lékařské fyziologie. Nakladatelství a vydavatelství H&H 1995.
- 2 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.
- 3 Border WA, Noble NA. TGF- β in kidney fibrosis: A target for gene therapy. *Kidney Int* 1997; 51: 1388-96.
- 4 Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-91.
- 5 Böttinger EP, Bitzer M. TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2600-10.
- 6 The Cytokine Handbook, 4th Edition, edited by Angus W.Thomson & Michael T.Lotze, 2003, London.
- 7 Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B. Going mad with smads. *N Engl J Med* 1999; 341: 1144-6.
- 8 Paul LC, Saito K, Davidoff A, Benediktsson H. Growth factor transcripts in rat renal transplants. *Am J Kidney Dis* 1996; 28: 441-50.
- 9 Waltenberger J, Miyazono K, Funa K, Wanders A, Fellstrom B, Heldin CH. Transforming growth factor-beta and organ transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25(2): 2038-40.
- 10 Azuma H, Nadeau K, Takada M, Tilney NL. Initial ischemia/reperfusion injury influences late functional and structural changes in the kidney. *Transplant Proc* 1997; 29(1-2): 1528-9.
- 11 Romberger DJ. Fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(7): 939-43.
- 12 Schena FP, Pertosa G. Fibronectin and the kidney. *Nephron*. 1988; 48(3): 177-82.

-
- 13 Gould VE, Martinez-Lacabe V, Virtanen I, et al. Differential distribution of tenascin and cellular fibronectins in acute and chronic renal allograft rejection. *Lab Invest* 1992; 67(1): 71-9.
 - 14 Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen-dependent and –independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59: 313-8.
 - 15 Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation* 1997; 64: 945-7.
 - 16 Tullius SG, Heemann U, Hancock WW, Azuma H, Tilney NL. Long-term kidney isografts develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection. *Ann Surg* 1994; 220(4): 425-32.
 - 17 Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997; 64(2): 190-7.
 - 18 Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF et al. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among S1, S2 and S3 segments. *Kidney Int* 1978; 14: 31-49.
 - 19 Torras J, Cruzado JM, Grinyo JM. Ischemia and reperfusion injury in transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31(6): 2217-8.
 - 20 Shackleton CR. Upregulation of major histocompatibility complex-expression under ischemic conditions in experimental models. *Transplant Proc* 1998; 30(8): 4264-6.
 - 21 Mohamed MA, Robertson H, Booth TA, Balupuri S, Kirby JA, Talbot D. TGF-beta expression in renal transplant biopsies: a comparative study between cyclosporin-A and tacrolimus. *Transplantation* 2000; 69(5):1002-5.

-
- 22 Cuhaci B, Kumar MS, Bloom RD, et al. Transforming growth factor-beta levels in human allograft chronic fibrosis correlate with rate of decline in renal function. *Transplantation* 1999; 68(6): 785-90.
- 23 Sharma VK, Bologa RM, Xu GP, Li B, Mouradian J, Wang J, Serur D, Rao V, Suthanthiran M. Intra-graft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49(5): 1297-303.
- 24 Sanders CE, Curtis JJ. Role of hypertension in chronic renal allograft dysfunction. *Kidney Int* 1995; Suppl 52: S43-7.
- 25 Paul LC, Benediktsson H. Post-transplant hypertension and chronic renal allograft failure. *Kidney Int* 1995; Suppl 52: S34-7.
- 26 Bohm M, Lee M, Kreutz R, et al. Angiotensin II receptor blockade in TGR(mREN2)27: effects of renin-angiotensin-system gene expression and cardiovascular functions. *J Hypertens* 1995; 13(8): 891-9.
- 27 Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; 344(6266): 541-4.
- 28 Szabo A, Lutz J, Schleimer K et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on growth factor mRNA in chronic renal allograft rejection in the rat. *Kidney Int* 2000; 57: 982-91.
- 29 Benediktsson H, Chea R, Davidoff A, Paul LC. Antihypertensive drug treatment in chronic renal allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1996; 62:1634-42.
- 30 Viklický O, Szabo A, Schleimer K et al. Inhibition of chronic rejection in rat renal allografts by enalapril treatment. *Akt Nefrol* 1998; 4: 68.
- 31 Benediktsson H, Chea R, Davidoff A, Paul LC. Antihypertensive drug treatment in chronic renal allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1996; 62:1634-42.

-
- 32 Amuchastegui SC, Azzollini N, Mister M et al. Chronic allograft nephropathy in the rat is improved by angiotensin II receptor blockade but not by calcium channel antagonism. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1948-55.
- 33 Peters H, Border WA, Noble NA. Targeting TGF- β overexpression in renal disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int* 1998; 54: 1570-80.
- 34 Cho YW, Terasaki PI. Long-term survival. *Clin Transpl* 1988; 277-82.
- 35 Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55(2): 713-23.
- 36 De Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000; 35(2): 333-46.
- 37 Briganti EM, Russ GR, McNeil JJ, Atkins RC, Chadban SJ. Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *N Engl J Med* 2002; 347(2): 103-9.
- 38 Rengel M, Gomes-Da-Silva G, Inchaustegui L, Lampreave JL, Robledo R, Echenagusia A, Vallejo JL, Valderrabano F. Renal artery stenosis after kidney transplantation: diagnostic and therapeutic approach. *Kidney Int Suppl* 1998; 68: S99-106.
- 39 Paul LC, Hayry P, Foegh M et al. Diagnostic criteria for chronic rejection/accelerated graft atherosclerosis in heart and kidney transplants: joint proposal from the Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs. *Transplant Proc* 1993; 25(2): 2022-3.

-
- 40 Solez K, Axelsen RA, Bennediktsson H et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal transplant rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44: 411-22.
- 41 Isoniemi HM, Taskinen E, Hayri P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58:1195-98.
- 42 Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG et al. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56:643-50.
- 43 Paul LC. Immunologic risk factors for chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation*. 2001;71(11 Suppl): S17-23.
- 44 Almond PS, Matas AJ, Gillingham K et al. Predictors of chronic rejection in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1993; 25: 936.
- 45 Rush D, Nickerson P, Jeffery J. Protocol biopsies in the management of renal allograft recipients. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9(6): 615-9.
- 46 Isoniemi H. The case for protocol kidney biopsies. *Transplant Proc* 2002; 34(5):1713-5.
- 47 Ponticelli C, Banfi G. The case against protocol kidney biopsies. *Transplant Proc* 2002; 34(5): 1716-8.
- 48 Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-33.
- 49 Final appraisal determination – immunosuppressive therapy for renal transplantation. National institute for clinical excellence. Issue date 2004.
- 50 Takada M, Chandraker A, Nadeu KC et al. The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 1997; 100: 1199-1203.

-
- 51 Dargun D, Tullius SG, Park JK et al. ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotides prevent reperfusion injury and enhance immediate graft function in renal transplantation. *Kidney Int* 1998; 54: 590-602.
- 52 Lincová D, Farghali H et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén 2002; s.519.
- 53 Fulton A, Markham A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic, pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 1996; 51: 278-98.
- 54 Jones EA, Shoskes DA. The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavonoids on renal ischemia-reperfusion injury and repair. *J Urol* 2000; 163:999-1004.
- 55 Glicklich D, Gupta B, Schurter-Frey G et al. Chronic renal allograft rejection. No response to mycophenolate mofetil. *Transplantation* 1998; 66: 398-99.
- 56 Fulton A, Markham A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic, pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 1996; 51: 278-98.
- 57 Danovitch GM. *Handbook of kidney transplantation*. Third edition. s. 65-77.
- 58 Peters DH, Fitton A, Plosker GL, Faulds D. Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 1993; 46: 746-9.
- 59 Felldin M, Bäckman L, Brattström C et al. Rescue therapy with tacrolimus (FK 506) in renal transplant recipients-a Scandinavian multicenter analysis. *Transpl Int* 1997; 10: 13-8.
- 60 Walgenbach KJ, Kalff JC, Sonmez-Alpan E et al. Upregulation of basic fibroblast growth factor during chronic rejection of rat intestinal allograft and its downregulation by FK 506. *Transplant Proc* 1998; 30: 2587.

-
- 61 Marx SO, Jayaraman T, Go LO, and Marx AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 76: 412-7.
- 62 Sehgal SN. Rapamune (sirolimus, rapamycin): An overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 660-65.
- 63 Terada N, Lucas JJ, Szepesi A et al. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol* 1993 Jan; 154(1): 7-15.
- 64 Molnar-Kimber KL. Mechanism of action of rapamycin (sirolimus, rapamune). *Transplant Proc* 1996; 28: 964-9.
- 65 Kahan BD, Podbielski J et al. Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1040-6.
- 66 Schulen W, Sedrani R, Cottens S et al. SDZ RAD, a new rapamycin derivate. Pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* 1997; 64: 36-42.
- 67 Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S at al. SDZ RAD, a new rapamycin derivate. Synergism with cyclosporine. *Transplantation* 1997; 64: 32-5.
- 68 Jenkins NP, Prendergast BD, Thomas M. Drug eluting coronary stents. *BMJ* 2002; 325(7376): 1315-6.
- 69 Granger DK, Cromwell JW, Chen SC et al. Prolongation of renal allograft survival in a large animal model by oral rapamycin monotherapy. *Transplantation* 1995;59(2):183-6.
- 70 Morris RE, Meiser BM. Identification of a new pharmacologic action for an old compound. *Med Sci Res* 1989; 17: 609.
- 71 Wasowska B, Wieder KJ, Hancock WW et al. Cytokine and alloantibody networks in long term cardiac allografts in rat recipients treated with rapamycin. *J Immunol* 1996; 156(1): 395-404.

-
- 72 Schmid C, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. Rapamycin inhibits transplant vasculopathy in long-surviving rat heart allografts. *Transplantation* 1995; 60(7):729-33.
- 73 Reichenspurner H, Soni V, Nitschke M et al. Obliterative airway disease after heterotopic tracheal xenotransplantation: pathogenesis and prevention using new immunosuppressive agents. *Transplantation* 1997; 64(3): 373-83.
- 74 Fahrni JA, Berry GJ, Morris RE, Rosen GD. Rapamycin inhibits development of obliterative airway disease in a murine heterotopic airway transplant model. *Transplantation* 1997; 63(4): 533-7.
- 75 Viklický O, Zou A, Müller V, Lácha J, Szabo A, Heemann U. SDZ RAD prevents manifestation of chronic rejection in rat renal allografts. *Transplantation* 2000; 69: 497-502.
- 76 Viklický O, Viklický V. Monoklonální protilátky po transplantaci ledviny. *Alergie* 2003; 5(4): 278-83.
- 77 Waldmann TA, O'Shea J. The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 507-12.
- 78 Nashan B, Moore R, Amlot P et al. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. *Lancet* 1997; 350:1193-8.
- 79 Kahan BD, Rajagopalan PR, Hall M. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. *Transplantation* 1999; 67: 276-84.
- 80 La Mauff B, Hourmant M, Rougier JP et al. Effect of anti-LFA1 (CD1-1a) monoclonal antibodies in acute rejection in human kidney transplantation. *Transplantation* 1991; 52: 291-6.

-
- 81 Azuma H, Chandraker A, Nadeau K et al. Blockage of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12439-12444.
- 82 Russel ME, Hancock WW, et al. Chronic cardiac rejection in the Lewis to F334 rat model: blockage of CD28-B7 costimulation by CTLA4Ig modulates T cell and macrophage activation and attenuates arteriosclerosis. *J Clin Invest* 1996; 97: 833-8.
- 83 Witte K, Schnecko A, Schmidt T et al. Cardiovascular risk, renal hypertensive damage, and effects of amlodipine treatment in transgenic TGR(mREN2)27 rats. *Gen Pharmacol* 1999; 33(5): 423-30.
- 84 Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, Allen TJ et al. A new model of diabetic nephropathy with progressive renal impairment in the transgenic (mRen-2)27 rat (TGR). *Kidney Int* 1998; 54(2): 343-52.
- 85 First MR, Neylan JF, Rocher LL, Tejani A. Hypertension after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4(8 Suppl):S30-6.
- 86 Jain S, Bicknell GR, Whiting PH, Nicholson ML. Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2): 556-8.
- 87 Wolf G, Muller E, Stahl RA et al. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1993; 92: 1366.
- 88 Gaedeke J, Peters H, Noble NA, Border WA. Angiotensin II, TGF-beta and renal fibrosis. *Contrib Nephrol* 2001; (135): 153-60.
- 89 Chen JH, Shou ZF, Zhu Z, Lee YM, Wu JY, Wang YM. Fibronectin plasma dynamics and determination significance after cadaveric kidney transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29(1-2): 175-6.

-
- 90 Matl I, Viklický O, Voska L, Lodererová A, Stříž I, Böhmová R, Vítko S. The effect of different immunosuppressive regimens on TGF- β 1 expression in kidney transplant patients. 11th congress of the European Society for Organ Transplantation, September 20th to 24th, Venice 2003, Abstracts 363 p.103.
- 91 Mohamed MA, Robertson H, Booth TA, Balupuri S, Kirby JA, Talbot D. TGF-beta expression in renal transplant biopsies: a comparative study between cyclosporin-A and tacrolimus. *Transplantation* 2000; 69(5): 1002-5.
- 92 Ochsner S, Guo Z, Binswanger U, Knoflach A. TGF-beta 1 gene expression in stable renal transplant recipients: influence of TGF-beta 1 gene polymorphism and immunosuppression. *Transplant Proc* 2002; 34(7): 2901-3.
- 93 Immunosuppression increases the TGF-beta1 plasma levels in kidney transplant recipients. Böhmova R, Matl I, Striz I, Viklicky O. 6th International Conference on New Trends in Immunosuppression, Salzburg, 2004.
- 94 Coupes BM, Newstead CG, Short CD, Brenchley PE. Transforming growth factor beta 1 in renal allograft recipients. *Transplantation* 1994; 57(12): 1727-31.
- 95 Junker U, Haufe CC, Nuske K, Rebstock K, Steiner T et al. Elevated plasma TGF-beta1 in renal diseases: cause or consequence? *Cytokine* 2000; 12(7): 1084-91.
- 96 Khanna A, Li B, Sehajpal PK et al. Mechanism of action of cyclosporine: A new hypothesis implicating transforming growth factor- β . *Transplant Rev* 1995; 9:41-48.
- 97 Coupes BM, Williams S, Roberts IS, Short CD. Plasma transforming growth factor beta(1) and platelet activation: implications for studies in transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(2): 361-7.
- 98 Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983; 258(11):7155-60.

-
- 99 Hughes JR, Hughes VF, Trull AK, Metcalfe SM. Blood levels of TGFbeta1 in liver transplant recipients receiving either tacrolimus or micro-emulsified cyclosporine. *Transplantation* 1999; 27: 68(4): 583-6.
- 100 Jain S, Furness PN, Nicholson ML. The role of transforming growth factor beta in chronic renal allograft nephropathy. *Transplantation* 2000; 69(9): 1759-66.
- 101 Shin GT, Khanna A, Ding R et al. In vivo expression of transforming growth factor-beta1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 1998; 65(3): 313-8.
- 102 El-Gamel A, Awad M, Yonan N et al. Does cyclosporin promote the secretion of transforming growth factor-beta 1 following pulmonary transplantation? *Transplant Proc* 1998; 30(4): 1525-7.
- 103 Hutchinson IV, Turner DM, Sankaran D et al. Influence of cytokine genotypes on allograft rejection *Transplant Proc* 1998; 30: 862-3.
- 104 Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P et al. Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene. *Transplantation* 2001; 66: 1014-20.
- 105 Holweg CT, Baan CC, Balk AH et al. The transforming growth factor-beta1 codon 10 gene polymorphism and accelerated graft vascular disease after clinical heart transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 1463-67.

7. SOUBOR PŘÍLOH

Příloha 1

Böhmová R, Viklický O. Renal ischemia-reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001; 46(4): 267-76.

Příloha 2

Viklický O, Böhmová R, Heemann UW. Ledviny, stárnutí a transplantace. *Čas Lék Česk* 2002; 141(24): 765-8.

Příloha 3

Böhmová R, Honsová E, Heemann U, Mandys V, Lodererová A, Matl I, Viklický O. Effect of sirolimus on ischemia/reperfusion injury in transgenic hypertensive rat. *Transplant Proc* 2002; 34(8): 3051-2.

Příloha 4

Viklický O, Böhmová R, Ouyang N, Honsová E, Lodererová A, Mandys V, Vítko Š, Lutz J, Heemann UW. Effect of sirolimus on renal ischaemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats. *Transpl Int* 2004; 17(8): 432-41.

Příloha 5

Matl I, Viklický O, Voska L, Lácha J, Teplan V, Vítko S. Naše první zkušenosti s protokolární biopsií transplanovaných ledvin. *Čas Lék Česk* 2004; 143(4): 253-6.

Příloha 6

Viklický O, Matl I, Voska L, Böhmová R, Jarešová M, Lácha J, Lodererová A, Stříž I, Teplan V, Vítko S. TGF-beta1 expression and chronic allograft nephropathy in protocol kidney graft biopsy. *Physiol Res* 2003; 52(3): 353-60.

Příloha 7

Matl I, Viklický O, Voska L, Lodererová A, Vítko Š. The effect of different immunosuppressive regimens on TGF-beta1 expression in kidney transplant patients. *Transpl Int* 2005; 18(6): 668-71.

Matl I, Viklický O, Voska L, Lodererová A, Stříž I, Böhmová R, Vítko S. The effect of different immunosuppressive regimens on TGF-β1 expression in kidney transplant patients. 11th Congress of the European Society for Organ Transplantation, Venice 2003, Abstracts 363 p.103.