



## SOUHRN

**Východisko.** TGF- $\beta$  je klíčovým profibrogenním cytokinem, který je spojován s patogenezi chronické transplantční 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- $\beta$ 1 a fibronektinu. Současně bylo cílem sledovat změny v plazmatických hladinách TGF- $\beta$ 1 a fibronektinu vzhledem k typu imunosuprese (IS).

**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- $\beta$ 1 v intimě cév.

Analýza protokolárních biopsií ledvin prokázala, že tkáňová exprese TGF- $\beta$ 1 koreluje mnohem více s chronickou transplantční vaskulopatií než se stupněm CTN. Mezi plazmatickými hladinami TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1 na typu IS rovněž nebyla prokázána.

## SUMMARY

**Background.** TGF- $\beta$  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- $\beta$ 1 plasma levels and plasma levels of fibronectin. Another aim was to evaluate TGF- $\beta$ 1 and fibronectin plasma levels in patients treated with different immunosuppressive (IS) regimens.

**Methods.** Experiments were performed in 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 IS regimens 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- $\beta$ 1 expression within the vessel intima. The analysis of protocol biopsies of transplanted patients has shown that TGF- $\beta$ 1 tissue expression is linked with chronic vasculopathy. We found no relation between plasma levels of TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1 plasma levels with the type of IS regime.

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| Souhrn / Summary  | 3  |
| Obsah   | 4  |
| Seznam grafických příloh  | 4  |
| Seznam zkratek  | 5  |
| 1. Úvod   | 6  |
| 1.1 Transplantace ledviny   | 6  |
| 1.2 Biologie TGF- $\beta$ , fibronectin   | 6  |
| 1.3 Nástroje ke studiu role TGF- $\beta$ v experimentální transplantologii a v klinice, imunosuprese  | 8  |
| 1.3.1 Experimentální modely   | 8  |
| 1.3.1.1 Ischemicko/reperfuční poškození (I/R)   | 8  |
| 1.3.1.2 Hypertenze a renin – angiotenzinový systém  | 8  |
| 1.3.1.3 Chronická rejekce   | 9  |
| 1.3.2 Protokolární biopsie štěpu u pacientů po transplantaci ledviny jako nástroj ke studiu role TGF- $\beta$ v klinické transplantologii         | 9  |
| 1.3.3 Imunosupresivní terapie   | 9  |
| 2. Cíl práce  | 11 |
| 3. Výsledky a diskuze   | 11 |
| 3.1 Experimentální část   | 11 |
| 3.2 Klinická část   | 12 |
| 3.2.1 Naše první zkušenosti s protokolární biopsií transplantovaných ledvin   | 12 |
| 3.2.2 Plazmatické hladiny TGF- $\beta$ 1, exprese TGF- $\beta$ 1 ve štěpu a chronická transplantační nefropatie v protokolárních biopsiích ledvin | 13 |
| 3.2.3 Plazmatické hladiny fibronectinu u pacientů 1 rok po transplantaci ledviny  | 14 |
| 3.2.4 Efekt různých imunosupresivních režimů na plazmatickou hladinu TGF- $\beta$ 1 a expresi TGF- $\beta$ 1 u pacientů po transplantaci ledvin   | 15 |
| 3.2.5 Imunosuprese zvyšuje plazmatické hladiny TGF- $\beta$ 1 u příjemců ledvin   | 16 |
| 4. Závěry   | 17 |
| 4.1 Experimentální část   | 17 |
| 4.2 Klinická část   | 17 |
| 5. Seznam vlastní literatury autora   | 18 |
| 6. Literatura   | 20 |

## SEZNAM GRAFICKÝCH PŘÍLOH

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Obr. č.1 | Signalizační kaskáda TGF- $\beta$  | 7  |
| Tab. č.1 | Demografická data  | 13 |
| Graf č.1 | Vztah plazmatických koncentrací TGF- $\beta$ 1 a exprese TGF- $\beta$ 1 ve štěpu | 14 |

## SEZNAM ZKRATEK

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| ALK                                  | activin receptor-like kinase  |
| BMI                                  | body mass index   |
| CAN                                  | chronic allograft nephropathy   |
| CHRI                                 | chronická renální insuficience  |
| Cl-kr                                | glomerulární filtrace vypočtená z clearance kreatininu                        |
| CR                                   | chronická rejekce   |
| Cs-A                                 | cyklosporin A   |
| CTN                                  | chronická transplantační nefropatie   |
| DNA                                  | deoxyribonukleová kyselina  |
| EC                                   | extracelulární  |
| EDTA                                 | kyselina ethylendiaminotetraoctová  |
| ELISA                                | enzyme-linked immunosorbent assay (enzymatická imunoesej)                     |
| Han SD                               | Hanover Sprague-Dawley  |
| HLA                                  | human leukocyte antigens  |
| IL                                   | interleukin   |
| I/R                                  | ischemie/reperfuze  |
| K                                    | kontrolní skupina pacientů  |
| MHC                                  | major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)           |
| mRNA                                 | „messenger“ ribonukleová kyselina   |
| PRA                                  | protilátky proti panelu   |
| PU                                   | proteinurie (ztráty bílkovin močí/24hod)                                      |
| RAD                                  | rapamycinový analog   |
| RAFT1/FRAP                           | rapamycin and FKBP target, FKBP and rapamycin associated protein              |
| RAS                                  | renin-angiotenzinový systém   |
| Ren                                  | renin   |
| R-Smad                               | receptory regulované proteiny Smad  |
| SIR                                  | sirolimus   |
| Smad                                 | protein signální dráhy TGF- $\beta$   |
| S-kr                                 | sérový kreatinin  |
| TAC                                  | tacrolimus  |
| Tkd                                  | krevní tlak diastolický   |
| Tks                                  | krevní tlak systolický  |
| TGF- $\beta$                         | transforming growth factor- $\beta$ (transformující růstový faktor- $\beta$ ) |
| TGF- $\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3 | izomerní formy TGF- $\beta$   |
| TGR                                  | transgenic rat (transgenní potkan)  |
| TOR                                  | target of rapamycine  |
| TX                                   | transplantace   |

# 1. ÚVOD

## 1.1 TRANSPLANTACE LEDVINY

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.

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. Radíme sem: pre-existující poškození štěpu, ischemicko/reperfuční 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. Všechny tyto faktory přispívají k poškození štěpu v procesu chronické transplantační nefropatie většinou nazývané jako chronická rejekce.

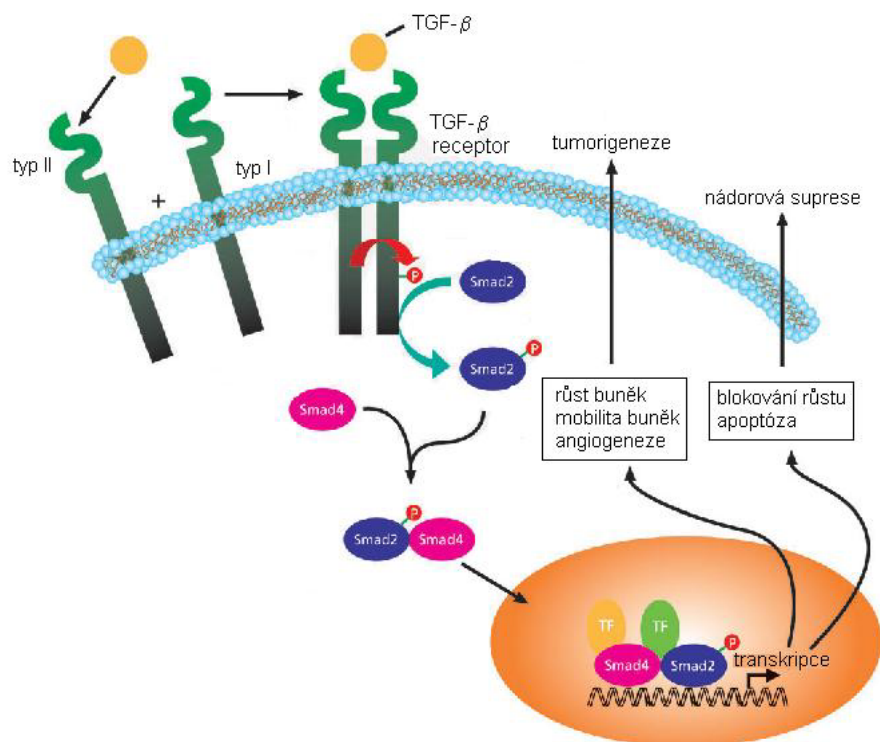
Chronická rejekce je vedle úmrtí příjemce nejčastější příčinou ztráty funkce transplantované ledviny v dlouhodobém průběhu a představuje tak vážný klinický problém současné transplantační medicíny<sup>1</sup>. Velkou roli v patogenezi chronické rejekce hrají především fibrotické procesy. Zástupcem cytokinů, který se na procesu fibrotizace výrazně podílí, je TGF- $\beta$ . Transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 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- $\beta$ . Pod jeho vlivem dochází k ukládání komponent extracelulární matrix v intersticiu.<sup>2</sup>

## 1.2 BIOLOGIE TGF- $\beta$ , FIBRONEKTIN

Transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) je členem rodiny růstových a diferenciacních faktorů, které regulují řadu biologických procesů, například buněčný růst a diferenciaci, indukují tvorbu extracelulární matrix a apoptózu.

TGF- $\beta$  existuje v pěti izomerních formách, z toho u savců se vyskytují tři izomerní formy TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1.

Při signalizaci TGF- $\beta$  je nutná spolupráce receptorů. 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- $\beta$  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.<sup>3</sup> Smad tak představují celou skupinu molekul podílejících se na nitro-buněčném 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 růstu<sup>4</sup> (obr. č. 1).



**Obr.č. 1** Signalizační kaskáda TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$  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- $\beta$ . Výsledkem těchto mechanismů je pak depozice extracelulární matrix.<sup>1</sup> TGF- $\beta$  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<sup>4,5</sup>. V imunitním systému má TGF- $\beta$  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 prozánětlivý<sup>6</sup>. Patogenetická role TGF- $\beta$  v imunologické aktivaci a procesu jizvení transplantované ledviny je tedy vysoce pravděpodobná. Bylo prokázáno, že vedle dalších faktorů vede ke zvýšené produkci TGF- $\beta$  také ischemie<sup>7</sup>.

#### *Fibronectin*

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.

## 1.3 NÁSTROJE KE STUDIU ROLE TGF- $\beta$ 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.<sup>8</sup>

### 1.3.1 Experimentální modely

#### 1.3.1.1 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. Ačkoliv zavedení lepších konzervačních roztoků do klinické praxe vedlo ke snížení rozsahu a závažnosti ischemického poškození, zůstává I/R poškození štěpů nadále velkým problémem.<sup>9</sup>

Morfologické změny shodné s chronickou rejeckí 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 isoštěpů<sup>10</sup>. Z těchto pozorování je možné usuzovat na silný vliv aloantigen nezávislých mechanismů na dlouhodobé výsledky transplantací ledvin<sup>11</sup>. 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 aloantigen 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- $\beta$ ).<sup>12</sup>

#### 1.3.1.2 Hypertenze a renin – angiotenzinový systém

Hypertenze je nejenom rizikovým faktorem rozvoje aterosklerotických změn, ale podílí se značnou měrou na progresi většiny chronických nefropatií<sup>13</sup>. Systémová hypertenze vede ke zvýšení intraglomerulárních tlaků. Jejich následkem dochází k poškození glomerulárních mezangiálních buněk a následné expresi extracelulární matrix vedoucí ke glomeruloskleróze.<sup>14</sup>

Transgenní potkani (transgenic rat, oficiální název kmen TGR(mREN-2)-27) představují experimentální model hypertenze závislé na angiotenzinu II<sup>15</sup>. Tento kmen potkanů byl vytvořen přenosem myšího ren-2 reninového genu do genomu potkanů kmene Hanover Sprague-Dawley (Han SD)<sup>16</sup>. 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 ledviny<sup>17</sup>.

### **1.3.1.3 Chronická rejekce**

Chronická rejekce (CR) představuje vedle úmrtí příjemce nejčastější příčinu ztráty funkce transplantované ledviny v dlouhodobém průběhu<sup>1</sup>. Tato špatně definovaná klinicko-patologická jednotka postihuje všechny transplantované orgány. Stále probíhají diskuze týkající se nomenklatury, charakteristiky a patogenze chronické formy rejekce. Chronická transplantovaná nefropatie, CTN (chronic allograft nephropathy - CAN) je popisný pojem histologických změn pozorovaných v ledvinných biopsiích.

Chronická rejekce je 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.<sup>18</sup>

Morfologickým korelátém 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.<sup>19</sup> Tyto změny mají za následek zmenšení počtu funkčních nefronů, alteraci a pozvolný zánik funkce štěpu.

### **1.3.2 Protokolární biopsie štěpu u pacientů po transplantaci ledviny jako nástroj ke studiu role TGF- $\beta$ 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 transplantovaná nefropatie<sup>20,21</sup>. Protokolární biopsie představují možnost jak studovat výskyt a rizikové faktory vzniku chronické transplantovaná 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.<sup>22</sup>

### **1.3.3 Imunosupresivní terapie**

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).

V posledních letech přicházejí do klinického užití mykofenolát mofetil, sirolimus, everolimus, basiliximab, daklizumab. Další imunosupresivní preparáty jsou ve fázi laboratorního zkoušení.



### *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 vlastnosti<sup>23</sup>. 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.<sup>24</sup>

Sirolimus tedy nebrzdí tvorbu cytokinů, jako jsou např. interleukin-2, 4, 7, 12, 15, destičkový růstový faktor a interferon- $\gamma$  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-2<sup>25</sup>. Navíc je silným inhibitorem B-buněčné proliferace a produkce imunoglobulinů<sup>26</sup>. Sirolimus je slabší inhibitor syntézy cytokinů než jsou cyklosporin A a tacrolimus.

Charakteristickým účinkem sirolimu je inhibice signálů růstových faktorů k imunokompetentním buňkám stejně tak jako k somatickým buňkám. Tento antiproliferační účinek se týká např. fibroblastů, endotelií a buněk hladkého svalstva cév.<sup>23</sup>

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 krvetvorby a zejména hypercholesterolemie a hypertriglycerolemie<sup>27</sup>. Hydroxylovaným derivátem sirolimu je RAD (everolimus, Certican®), který má 2-3x nižší imunosupresivní aktivitu *in vitro*, ale *in vivo* je srovnatelně účinný se sirolimem<sup>28</sup>.

Z experimentálních studií<sup>29,30</sup> 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 ztlustění 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.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo studium transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ 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 $\beta$ -1.

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

## 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 3.1 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

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 rejeckce 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 skupiny<sup>9</sup> 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.<sup>31</sup> 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)<sup>16</sup>. Bylo experimentálně prokázáno, že aktivace RAS způsobuje progresi renální dysfunkce s proteinurií a zvětšuje rozsah strukturálních změn.<sup>32,33</sup> 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 nefropatie<sup>34</sup>. 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 výší proteinurie. V případě hypertenzních potkanů po I/R inzultu se proteinurie objevila brzy a na konci sledování bylo závažné i poškození ledvinné struktury.<sup>31</sup> Normotenzní zvířata léčená imunosupresivem rapamycinem - sirolimem měla významně nižší proteinurii i rozsah glomerulosklerózy v porovnání s kontrolní skupinou. Tento nálezn je zcela v souladu s publikovanou literaturou<sup>35</sup>. 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 inzultu. 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- $\beta$ 1 na endotelu cév u léčených zvířat může vysvětlit patogenezi cévního poškození.<sup>36</sup>

Studie posledního desetiletí ukazují, že jak angiotenzin II tak TGF- $\beta$ 1 hrají důležitou úlohu v procesu fibrogenese<sup>37</sup>. Ví se, že těžký inzult, jakým je I/R poškození může vyvolat fibrózu. Basile ve své studii demonstroval zvýšenou expresi TGF- $\beta$ 1 po renálním I/R poškození. Vzhledem k tomu, že růstové faktory se podílejí na vývoji glomerulosklerózy a intersticiální fibrózy<sup>38</sup>, 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- $\beta$ 1<sup>35</sup>.

V našem krátkodobém experimentu bylo pozorováno snížení exprese TGF- $\beta$ 1 pouze v intimě cév, nikoli však v ostatních renálních strukturách.<sup>36</sup> 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- $\beta$ 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 glomerulosklerózy a významně snížila expresi TGF- $\beta$ 1 v intimě cév. Naše pozorování je tak ve shodě s hypotézou, že léčba sirolimem příznivě ovlivní chronickou vaskulopatii transplantované ledviny.<sup>36</sup>

V dlouhodobé studii jsme dále zjistili, že geneticky navozená hypertenze významně akceleruje chronické změny v renálním parenchymu po I/R poškození jedné ledviny.<sup>31</sup>

## 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 jejich 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.

Bioptické vzorky byly hodnoceny histomorfologicky podle kritérií Banffské 97' klasifikace<sup>39</sup> s cílem zhodnotit stupeň chronické transplantační nefropatie (CTN) 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- $\beta$ 1, fibronektinu a exprese TGF- $\beta$ 1 ve štěpu.

|   | N                 | Korelace s morfologií |
|---|-------------------|-----------------------|
| Soubor s provedenou protokolární biopsií      | 105               |                       |
| M/Ž   | 73/32             |                       |
| Průměrný věk                                  | 50,54 $\pm$ 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 $\pm$ 1       | NS                    |
| Protilátky proti panelu (PRA) [%]             | 18,9 $\pm$ 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.<sup>40</sup> Z tohoto souboru jsme pak dále vycházeli v následujících dílčích studiích.

### 3.2.2 Plazmatické hladiny TGF- $\beta$ 1, exprese TGF- $\beta$ 1 ve štěpu a chronická transplantační nefropatie v protokolárních biopsiích ledvin

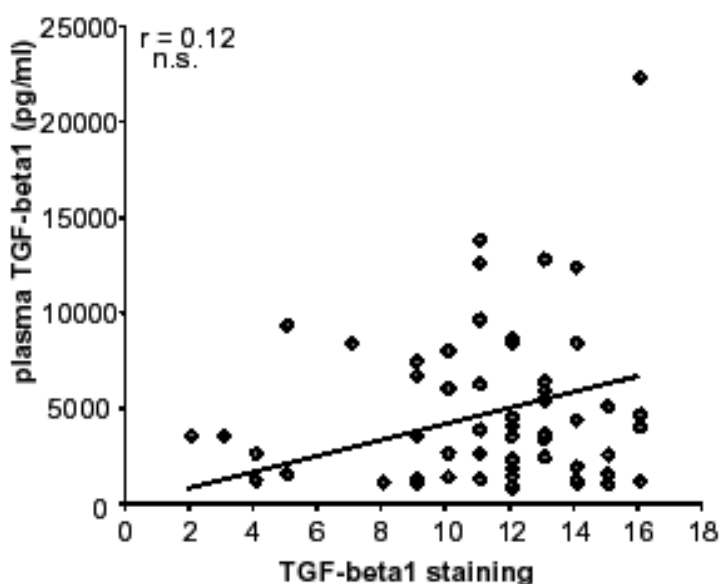
V této části jsme se zaměřili pouze na skupinu pacientů (n=67) kteří dostávali imunosupresi založenou na cyklosporinu A (s cílovou hladinou 150-250 ng/ml) v

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- $\beta$ 1 a exprese TGF- $\beta$ 1 ve štěpu.

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- $\beta$ 1. Plazmatické hladiny TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1 u pacientů s větší expresí TGF- $\beta$ 1 ve štěpu (graf č.1), nenašli jsme jednoznačný vztah mezi plazmatickými hladinami TGF- $\beta$ 1 a funkcí štěpu, stupněm CTN, chronické vaskulopatie ani cílovou hladinou cyklosporinu A. V této studii však byl nalezen signifikantní vztah mezi expresí TGF- $\beta$ 1 ve štěpu a chronickou vaskulopatií ( $p < 0,01$ ). Zdá se tedy, že tkáňová exprese TGF- $\beta$ 1 koreluje mnohem více s chronickou transplantační vaskulopatií než se stupněm chronické transplantační nefropatie.<sup>41</sup>



**Graf č. 1** Vztah plazmatických koncentrací TGF- $\beta$ 1 a exprese TGF- $\beta$ 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 reagensí 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 transplantální nefropatie (CTN), cévním změnám, expresi TGF- $\beta$ 1 a k plazmatickým hladinám TGF- $\beta$ 1 byly rovněž bez statistické významnosti. Rovněž při porovnání dvou skupin pacientů léčených trojkombinací imunopresiv, 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 fibronectin 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 rejekce, akutní tubulární nekrózy a infekcí) a prognózy výsledku transplantace<sup>42</sup>.

### 3.2.4 Efekt různých imunopresivních režimů na plazmatickou hladinu TGF- $\beta$ 1 a expresi TGF- $\beta$ 1 u pacientů po transplantaci ledvin

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

Biopsické vzorky byly opět hodnoceny histomorfologicky podle kritérií Banffské 97' klasifikace, imunohistologicky k průkazu TGF- $\beta$ 1 a z krevního odběru v den biopsie byly stanovovány plazmatické hladiny TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 exprese byla analyzována s použitím primární protilátky anti-human TGF- $\beta$ 1 protilátka (Biosource Int, CA, USA) a hodnocena semikvantitativně v různých renálních strukturách. Klinická a laboratorní data (včetně plazmatických hladin TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1 v plazmě byly u tacrolimové skupiny signifikantně vyšší než u skupiny léčené cyklosporinem A ( $7206 \pm 4799$  vs.  $5366 \pm 4427$  pg/ml),  $p < 0,05$ ). Po 12 měsících sledování tyto hodnoty ještě signifikantně vzrostly u tacrolimu na  $12613 \pm 5672$  pg/ml ( $p < 0,001$ ) a cyklosporinu A na  $9275 \pm 4427$  pg/ml ( $p < 0,05$ ). Nenalezli jsme žádné korelace s klinickými nebo laboratorními daty. Zjistili jsme však, že exprese TGF- $\beta$ 1 ve štěpu byla naopak nižší u pacientů léčených tacrolimem v porovnání s cyklosporinovou skupinou ( $5,0 \pm 3,2$  vs.  $9,9 \pm 4,1$   $p < 0,001$ ).<sup>43</sup> Toto naše zjištění bylo publikováno<sup>44</sup> a je ve shodě s obdobným nálezem u pacientů po transplantaci ledviny<sup>45,46</sup>.

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 signifikantními poklesu glomerulární filtrace u cyklosporinové skupiny zatímco u tacrolimové zůstala nezměněna.

Z našeho pozorování signifikantně nižší exprese TGF- $\beta$ 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 imunopresiva tacrolimu na dlouhodobé přežívání štěpu.

### 3.2.5 Imunosuprese zvyšuje plazmatické hladiny TGF-β1 u pacientů po transplantaci ledvin

V této nepublikované studii jsme analyzovali plazmatické hladiny TGF-β1 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 μmol/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)

#### *Výsledky*

Zjistili jsme, že skupina transplantovaných (n=97) měla signifikantně vyšší plazmatickou hladinu TGF-β1 ve srovnání se skupinou pacientů s chronickou renální insuficiencí resp. se zdravými kontrolami (3,57±0,55 vs 2,99±1,20 ng/ml; p<0,01 a 3,57±0,55 vs 2,43±1,13 ng/ml; p<0,01). Nepozorovali jsme žádné rozdíly v plazmatických hladinách TGF-β1 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±4,14; TAC: 6,56±4,96 a RAD: 7,38±6,48 ng/ml; Kruskal-Wallis test: n.s.). Renální funkce transplantovaných pacientů a pacientů s CHRI se nijak významně nelišily (1,10±0,43 vs 0,81±0,59 ml/s; n.s.).<sup>47</sup>

#### *Diskuze a závěr*

Námi pozorovaný vzestup plazmatických hladin TGF-β1 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-β1 v závislosti na typu imunosuprese. Naše pozorování je tak v souladu se studií, ve které jsou popisovány vyšší hladiny TGF-β1 u nemocných s transplantovanou ledvinou ve srovnání se zdravými nebo nemocnými s glomerulonefritidou<sup>48</sup>. Jiná studie však popisuje normální hladiny TGF-β1 jak u kontrol, tak u transplantovaných pacientů a naopak vyšší hladiny TGF-β1 jen u některých ledvinných onemocnění spojených s chronickou renální insuficiencí a nutností dialyzační léčby<sup>49</sup>.

## 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- $\beta$ 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- $\beta$ 1 ve štěpu a chronickou vaskulopatií. Tkáňová exprese TGF- $\beta$ 1 tedy koreluje mnohem více s chronickou transplantační vaskulopatií než se stupněm chronické transplantační nefropatie (CTN).
2. Mezi plazmatickými hladinami TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1 a k plazmatickým hladinám TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 1 u pacientů po transplantaci ledviny s různými imunosupresivními režimy oproti skupině netransplantovaných pacientů s chronickou renální insuficiencí byl zjištěn vzestup plazmatických hladin TGF- $\beta$ 1 u transplantovaných pacientů. Zdá se tedy, že vzestup plazmatických hladin TGF- $\beta$ 1 nemusí být spojen s chronickou renální insuficiencí a je nejspíše odrazem systémové imununosuprese. Významná závislost plazmatických hladin TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 1 expression in kidney transplant patients. 11<sup>th</sup> 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$  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 transplantačního 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 Cho YW, Terasaki PI. Long-term survival. Clin Transpl 1988; 277-82.
  - 2 Border WA, Noble NA. TGF- $\beta$  in kidney fibrosis: A target for gene therapy. Kidney Int 1997; 51: 1388-96.
  - 3 Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B. Going mad with smads. N Engl J Med 1999; 341: 1144-6.
  - 4 Böttinger EP, Bitzer M. TGF- $\beta$  signaling in renal disease. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 2600-10.
  - 5 Paul LC, Saito K, Davidoff A, Benediktsson H. Growth factor transcripts in rat renal transplants. Am J Kidney Dis 1996; 28: 441-50.
  - 6 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.
  - 7 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.
  - 8 Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. Transplantation 1995; 59: 313-8.
  - 9 Böhmová R, Viklický O. Renal ischemia-reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome. Folia Microbiol 2001; 46(4): 267-76.
  - 10 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.
  - 11 Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. Transplantation 1997; 64(7): 945-7.

- 
- 12 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.
  - 13 Sanders CE, Curtis JJ. Role of hypertension in chronic renal allograft dysfunction. *Kidney Int* 1995; Suppl 52: S43-7.
  - 14 Paul LC, Benediktsson H. Post-transplant hypertension and chronic renal allograft failure. *Kidney Int* 1995; Suppl 52: S34-7.
  - 15 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.
  - 16 Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; 344(6266): 541-4.
  - 17 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.
  - 18 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.
  - 19 Solez K, Axelsen RA, Benediktsson 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.
  - 20 Paul LC. Immunologic risk factors for chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation*. 2001;71(11 Suppl): S17-23.
  - 21 Almond PS, Matas AJ, Gillingham K et al. Predictors of chronic rejection in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1993; 25: 936.
  - 22 Rush D, Nickerson P, Jeffery J. Protocol biopsies in the management of renal allograft recipients. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9(6): 615-9.
  - 23 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.
  - 24 Sehgal SN. Rapamune (sirolimus, rapamycin): An overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 660-65.
  - 25 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.
  - 26 Molnar-Kimber KL. Mechanism of action of rapamycin (sirolimus, rapamune). *Transplant Proc* 1996; 28: 964-9.
  - 27 Kahan BD, Podbielski J et al. Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1040-6.
  - 28 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.
  - 29 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.
  - 30 Morris RE, Meiser BM. Identification of a new pharmacologic action for an old compound. *Med Sci Res* 1989; 17: 609.
  - 31 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.

- 
- 32 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.
  - 33 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.
  - 34 First MR, Neylan JF, Rocher LL, Tejani A. Hypertension after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4(8 Suppl):S30-6.
  - 35 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.
  - 36 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.
  - 37 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.
  - 38 Gaedeke J, Peters H, Noble NA, Border WA. Angiotensin II, TGF-beta and renal fibrosis. *Contrib Nephrol* 2001; (135): 153-60.
  - 39 Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55(2): 713-23.
  - 40 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.
  - 41 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.
  - 42 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.
  - 43 Matl I, Viklický O, Voska L, Lodererová A, Stříž I, Böhmová R, Vítko S. The effect of different immunosuppressive regimens on TGF- $\beta$ 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.
  - 44 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.
  - 45 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.
  - 46 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.
  - 47 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.
  - 48 Coupes BM, Newstead CG, Short CD, Brenchley PE. Transforming growth factor beta 1 in renal allograft recipients. *Transplantation* 1994; 57(12): 1727-31.
  - 49 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.