

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Markery transplantační tolerance po transplantaci ledviny

MUDr. Eva Krepsová

2016

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika nefrologie, IKEM, Praha

Školitel: prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

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

OBSAH

OBSAH.....	1
ABSTRAKT	2
ABSTRACT	3
1. ÚVOD	4
2. HYPOTÉZY A CÍLE	6
Hypotézy.....	6
Cíle	6
3. METODY.....	7
Pacienti a vzorky.....	7
Renální biopsie a léčba rejekce	7
Průtoková cytometrie mononukleárních buněk periferní krve.....	7
<i>In vitro</i> stimulace a měření periferních mononukleárních buněk.....	8
Analýza genové exprese	8
Statistická analýza	9
4. VÝSLEDKY.....	10
4.1. Vliv indukční imunosuprese na regulační T lymfocyty	10
4.2. Vliv indukční imunosuprese na expresi genů asociovaných s tolerancí a rejekcí	11
4.3. Subpopulace monocytů po transplantaci ledviny	12
4.4. Biomarkery tolerance spojené s funkcí B lymfocytů	13
5. DISKUZE	14
6. ZÁVĚRY.....	19
7. CONCLUSIONS	20
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	21
PUBLIKACE	24

ABSTRAKT

Pro dlouhodobé přijetí transplantované ledviny je zatím nezbytná dlouhodobá účinná imunosuprese, která však s sebou nese řadu nežádoucích účinků. Naopak, při její nedostatečnosti hrozí rejekce a selhání funkce štěpu. Proto se hledají nové biomarkery, které by odrážely imunologický stav pacienta, a umožnily by tak individualizovat imunosupresivní léčbu. Prokázali jsme, že pacienti po transplantaci ledviny po indukci králičím anti-thymocytárním globulinem (rATG) či basiliximabem měli snížený výskyt akutní rejekce 3 měsíce po transplantaci. Po rATG došlo v periferní krvi příjemců k hluboké depleci T a NK lymfocytů a poklesu exprese genů výhradně exprimovaných těmito buňkami zároveň s výraznou expanzí regulačních T lymfocytů (Treg) v CD4⁺ kompartmentu. Indukce rATG byla dále krátce po transplantaci spojena se zvýšením dvou transkriptů asociovaných s rejekcí (*MAN1A1* a *TLR5*). Po indukci basiliximabem jsme v krvi přechodně detekovali CD4⁺CD25^{low}/FoxP3⁺ populaci současně s vymizením CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg. Absolutní počty CD4⁺FoxP3⁺ Treg po basiliximabu byly přechodně zvýšené a tato léčba byla také spojená s vyšší expresí genů *FOXP3* a *TCA1M*. Dále jsme pozorovali vyšší poměr CD4⁺FoxP3⁺ Treg k CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ efektorovým T lymfocytům v potransplantačním období u pacientů s indukci basiliximabem, kteří během sledování neprodělali rejekci. Také jsme prokázali, že transplantace ledviny je spojena se změnou počtů CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů, která je částečně ovlivněna použitou imunosupresí. Ukázali jsme, že i u pacientů po transplantaci ledviny léčených standardní imunosupresí, kteří během jednorozhodného sledování neprodělali rejekci, byla zvýšená exprese genů asociovaných s tolerancí spojených s funkcí B lymfocytů. Domníváme se, že nové biomarkery tolerance představují naději pro budoucí potransplantační sledování, ale jejich užitečnost musí být validována v prospektivních klinických studiích.

ABSTRACT

Long-term renal graft acceptance still requires long-term immunosuppressive therapy, which is accompanied by many adverse effects. Contrarily insufficient immunosuppression could lead to graft rejection and its failure. Therefore, research continues for biomarkers that reflect a patient's immunological status and thus allowing for individualized immunosuppressive therapy. In our study we showed lower incidence of acute rejection in kidney transplant recipients treated with rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) or basiliximab induction within the first three months after transplantation. The rATG induction caused profound decrease of recipient's peripheral blood T and NK cells, as well as transcripts that are exclusively expressed by these cell types together with expansion of regulatory T cells (Tregs) among CD4⁺ T cells. In rATG group the increase of two transcripts associated with rejection (*MAN1A1* and *TLR5*) was also observed in early post-transplant period. After the basiliximab induction we transiently detected CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ cell population along with disappearance of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs. Basiliximab induction resulted in a transient increase in CD4⁺FoxP3⁺ Tregs, accompanied by the highest peripheral expression levels of markers associated with operational tolerance (*FOXP3* and *TCA1M*). Higher post-transplant CD4⁺FoxP3⁺ Tregs to CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ effector T cells ratios were observed in those basiliximab treated patients who were rejection free during a follow-up. Further, we demonstrated that kidney transplantation is associated with modulation of CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺CD163⁺ monocyte subpopulations partially affected by an immunosuppressive regime used. We showed the up-regulation of several operational tolerance-associated B-cell-related genes also in renal transplant recipients on standard immunosuppression who were rejection-free during one-year follow-up. We assume that new biomarkers of tolerance represent a hope for future post-transplant monitoring, however, their utility need to be validated in prospective clinical trials.

1. ÚVOD

Transplantace ledviny je metodou volby léčby nemocných s nezvratným selháním ledvin, protože je spojena s delším přežitím nemocných v porovnání s ostatními metodami náhrady funkce ledvin. Pro dlouhodobé přijetí transplantované ledviny je zatím nezbytná dlouhodobá účinná imunosuprese. Při nedostatečné imunosupresi může dojít k rejekci štěpu, která může způsobit poškození štěpu vedoucí k jeho dysfunkci. Podle časového hlediska se rejekce dělí na akutní a chronické. Podle toho, jaký typ imunitní odpovědi se při rejekci uplatní, na humorální (zprostředkované protilátkami, antibody-mediated rejection, ABMR) a celulární (zprostředkované T lymfocyty, T cell-mediated rejection, TCMR). Mnoho rejekcí má současně přítomné obě formy.

Zavedením kalcineurinových inhibitorů (CNI) cyklosporinu A (1985) a tacrolimu (1994) do klinické praxe došlo k významnému snížení výskytu akutních rejekcí po transplantaci a tím i ke zlepšení přežívání štěpů i příjemců v časném období po transplantaci, dlouhodobé přežívání štěpů se však výrazně nezlepšilo a chronická rejekce zůstává hlavní příčinou ztráty funkce štěpu v pozdním období po transplantaci (Amico, 2010). Používání nových účinných imunosupresivních režimů je navíc spojeno s významně vyšším rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění, infekcí, diabetu, malignit a lékové nefrotoxicity. Tumory a kardiovaskulární choroby jsou nejčastějšími příčinami úmrtí po transplantaci ledviny, zatímco infekce jsou nejčastější příčinou nemoci a nejčastější indikací k hospitalizaci (Dharnidharka *et al.*, 2004).

V nedávné minulosti jsme byli svědky snah o podávání co nejmenších dávek imunosupresiv. Cílem bylo snížit rizika vzniku výše uvedených komplikací spojených s imunosupresivní léčbou. Tato strategie ale neměla očekávaný pozitivní dopad na dlouhodobé výsledky transplantací ledvin především pro často pozorované zhoršení funkce štěpů a pozdní rejekce. Problém spočívá v neschopnosti rozpoznat ty nemocné, u kterých je snížení dávek imunosupresiv bezpečné. Ideálním řešením by bylo mít k dispozici takové testy, které popíší vlohy k imunitní reaktivitě, spolehlivě vyhodnotí míru aloreaktivity a umožní tak identifikovat markery, které korelují s imunitní neodpovídavostí k alogennímu štěpu, tedy markery tolerance. Proto se v posledních letech věnuje velká pozornost fenoménu operační tolerance. Ten je náhodně zjišťován u pacientů po transplantaci ledvin (nebo jater), kteří přestali užívat imunosupresi v důsledku noncompliance nebo z nutnosti vysazení například pro malignitu nebo lékovou toxicitu (Ashton-Chess *et al.*, 2007).

Skutečná, pravá tolerance štěpu byla definována již v roce 1953 Billinghamem *et al.* jako absence histologických známek rejekce, v nepřítomnosti jakéhokoli imunosupresivního léčiva, u imunokompetentního příjemce schopného přijmout druhý štěp od stejného dárce, zatímco štěp od jiného dárce by byl odhojen (Billingham *et al.*, 1953). Pionýrské práce Haška (Hasek *et al.*, 1955) přinesly stejné závěry jako práce Medawara a spol. (Medawar, 1956).

V klinické medicíně se používá termín „operační tolerance“ (“operational tolerance“) nebo „klinická operační tolerance“ (“clinical operational tolerance“). Operační tolerance je definována jako

absence známek poškození štěpu (funkčních i histologických) u pacientů po transplantaci bez imunosupresivní terapie více jak 1 rok. Stav operační tolerance po transplantaci ledviny je popisován relativně zřídka (<0,1%) v porovnání s výskytem po transplantaci jater (zhruba 10% - 15%) (Martinez-Llordella *et al.*, 2008; Martinez-Llordella *et al.*, 2007; Roussey-Kesler *et al.*, 2006). V posledních letech je předmětem klinických studií několik protokolů s cílem navodit trvalé přijetí štěpu s žádnou nebo nízkodávkovou imunosupresí za použití ozáření, transplantace hematopoetických kmenových buněk, imunosuprese, případně speciálních buněčných populací včetně expandovaných regulačních T lymfocytů (Treg) (Elias *et al.*, 2015; Girmanova *et al.*, 2015). Dosavadní výsledky ale zatím neumožňují bezpečné širší použití. Proto se hledají nové biomarkery, které by identifikovaly předtransplantační imunitní riziko a po transplantaci včas odhalily začátek imunitní odpovědi proti štěpu (markery rejekce) nebo naopak stav neodpovídavosti vůči štěpu (markery tolerance), což by umožnilo nastavit imunosupresivní terapii dle potřeby každého pacienta (individualizovaná imunosuprese), čili předejít tomu, aby funkce imunitního systému byly potlačeny méně nebo více, než je třeba.

Stav imunitního systému před transplantací i po ní lze hodnotit funkčními testy, fenotypizací leukocytů a genovou a proteinovou expresní analýzou. Mezi funkční testy patří metody k detekci anti-HLA protilátek (stanovení panel reaktivních protilátek (PRA), cross-match test (CM), Luminex) a donor reaktivních T lymfocytů (IFN- γ ELISPOT). Fenotypizace leukocytů se provádí pomocí průtokové cytometrie. Genová expresní analýza využívá microarray technologie a metody kvantitativní real-time RT-PCR (qRT-PCR). K analýze proteinové exprese slouží metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, enzymová imunoanalýza).

2. HYPOTÉZY A CÍLE

Hypotézy

Předpokládali jsme, že indukční imunoprese rATG vede k vzestupu počtu Treg a změněné expresi dalších biomarkerů transplantační tolerance, které se uplatňují v dlouhodobém přijetí štěpu. Stejně tak by po podání rATG mělo dojít ke změně exprese markerů rejekce asociovaných s T lymfocyty. Indukční léčba basiliximabem (jakožto nedepleční protilátkou zaměřenou proti receptoru pro IL-2) nemusí ovlivnit počty Treg, ale může ovlivnit expresi biomarkerů tolerance či rejekce asociovaných s T lymfocyty.

Dále jsme očekávali, že přítomnost a/nebo změněné množství nově identifikovaných biomarkerů transplantační tolerance (či rejekce) v periferní krvi a v biopsicky získaném vzorku tkáně ledvinného štěpu u pacientů po transplantaci ledviny jsou spojeny s přijetím štěpu a absencí rejekce (či naopak s přítomností rejekce).

Cíle

1. Zhodnotit efekt různé indukční léčby na regulační T lymfocyty v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny a analyzovat asociaci počtů těchto buněk s krátkodobými výsledky transplantace. Prokázat, že u pacientů s vyšším rizikem rejekce dojde po podání indukční terapie rATG ke změně počtu regulačních T lymfocytů.
2. Zhodnotit efekt (a případný tolerogenní potenciál) různé indukční léčby na expresi genů asociovaných s tolerancí či rejekcí a počty lymfocytárních subpopulací exprimujících tyto geny v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny.
3. Monitorovat změny v monocytárních subpopulacích a jejich distribuci v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny léčených standardní imunopresí také s ohledem na různé použité imunopresivní režimy.
4. Zjistit, zda změny v míře exprese genů asociovaných s operační tolerancí budou v periferní krvi a ve štěpu příjemců ledviny léčených imunopresí spojeny s absencí rejekce v transplantované ledvině.

3. METODY

Studie vychází z řešení grantového projektu (IGA MZCR NS 10517-3/2009), jehož cílem bylo analyzovat různé markery rejekce a tolerance v prospektivní observační studii.

Pacienti a vzorky

Do studie bylo zařazeno celkem 75 pacientů, kterým byla transplantována ledvina od zemřelého dárce v období mezi zářím 2009 a listopadem 2010 v Transplantcentru Institutu klinické a experimentální medicíny. Pacienti byli léčeni podle léčebného protokolu centra, který zahrnoval trojkombinaci udržovací imunosupresivní terapie s kalcineurinovým inhibítorem (CNI, tacrolimus nebo cyklosporin A), mykofenolátem mofetilem a kortikosteroidy, s indukční imunosupresí či bez ní. Volba indukční léčby se řídila imunologickým rizikem pacienta. Pacienti s PRA \geq 50% nebo ti, kteří již v minulosti podstoupili transplantaci ledviny, byli léčeni 1-1.5 mg/kg/den rATG (Thymoglobulin®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA n = 28) i.v. ve 2-7 dávkách během prvního týdne po transplantaci. Pacienti s PRA 20-49% nebo ti, kteří obdrželi ledvinu od dárce s rozšířenými kritérii, byli léčeni 2x 20 mg basiliximabu (Simulect®, Novartis, Basel, Switzerland, n = 22) i.v. a to v den transplantace a 4 dny po transplantaci. Pacientům s PRA < 20% nebyla podána žádná indukční léčba (n = 25). Vzorky periferní krve pacientů byly odebrány před transplantací a 7., 14., 21., 28., 60., 90. den a 6 a 12 měsíců po transplantaci. Skupiny pacientů se kromě zastoupení retransplantací, PRA a věku dárce nelišily v klinických charakteristikách. Ze 75 pacientů 4 pacienti podstoupili graftektomii (4., 20., 58. a 161. den po transplantaci) z důvodu trombózy v. renalis, akutního krvácení po biopsii, primární afunkce štěpu ledviny a sekundární afunkce štěpu ledviny; dva pacienti zemřeli (56. a 80. den po transplantaci) na náhlou smrt a embolii plicnice a dva pacienti vystoupili ze studie 14. respektive 60. den po transplantaci.

Renální biopsie a léčba rejekce

Renální biopsie byly prováděny z klinické indikace (při podezření na rejekci) a dále u každého příjemce 90. den po transplantaci dle protokolu („protokolární biopsie“). Histologické nálezy byly hodnoceny podle Banffské klasifikace z roku 2005 (17). Hraniční změny a T buňkami zprostředkovaná rejekce (TCMR) stupně I a IIA byly léčeny pulzně podávaným methylprednisolonem v celkové dávce 1,5-2 g. TCMR stupně IIB a III a steroid-rezistentní TCMR byly léčeny i.v. podávaným rATG v nejvíce 10 dávkách (2 mg/kg 1. den a 1 mg/kg 2.-10. den). Protilátkami zprostředkovaná rejekce byla léčena výměnou plazmy a intravenózními imunoglobuliny střídavě obden během 10-denního období.

Průtoková cytometrie mononukleárních buněk periferní krve

Vzorky periferní krve byly odebírány do sterilních zkumavek s EDTA. Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) byly izolovány centrifugací na hustotním gradientu (Lymphoprep™, Axis-Shield, Oslo, Norway) a značeny monoklonálními protilátkami (mAb) konjugovanými

s fluorochromy. Barvení k identifikaci FoxP3⁺ Treg bylo provedeno pomocí soupravy Human Regulatory T Cell Staining Kit dle doporučení výrobce (eBioscience, San Diego, CA, USA). Intracelulární značení FoxP3 bylo provedeno po povrchovém značení liniově specifických znaků. Po obarvení byly vzorky změřeny pomocí průtokového cytometru FC 500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) a analyzovány za použití software CxP a Kaluza (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Analýza pomocí průtokové cytometrie byla prováděna s alespoň 100 případy v gate. Absolutní počty buněčných populací byly vypočítány z absolutních počtů lymfocytů či leukocytů změřených pomocí hematologického analyzátoru Sysmex (Sysmex Corporation, Japan).

***In vitro* stimulace a měření periferních mononukleárních buněk**

Pro *in vitro* experiment byla použita periferní krev 3 zdravých dobrovolníků (ve věku 30-55let), bez klinických příznaků nemoci, signifikantních klinických diagnóz a transplantace v anamnéze. PBMC dobrovolníků byly resuspendovány v RPMI-1640 mediu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) s přidavkem 10% FCS (fetální telecí sérum), L-glutaminu, penicilinu a streptomycinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a centrifugovány po dobu 10 min při 180 × g. Po té byly buňky kultivovány v termostatu při 37°C v 5% CO₂ v RPMI-1640 mediu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a stimulovány rATG (v koncentraci 1, 10 a 100 ug/ml), basiliximabem (v koncentraci 1, 10, 100 a 1000 ng/ml) nebo methylprednisolonem (v koncentraci 10, 100 a 1000 ug/ml). Jako negativní kontroly byly použity nestimulované buňky. Buňky byly uvolněny z povrchu kultivačních jamek pomocí Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Zastoupení CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů bylo měřeno v duplikátech pomocí průtokového cytometru FC 500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) v čase 0, 1, 3, 6, 24, 48 a 72 hodin po stimulaci. Viabilita buněk byla posouzena pomocí analyzátoru Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Analýza genové exprese

Pro analýzu genové exprese z krve byla odebrána periferní krev přímo do zkumavek PAXgene (Qiagen, Hilden, Germany). Krev byla zmrazena a skladována při -20° C. RNA z plné krve byla extrahována pomocí soupravy PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany), tkáň získaná renální biopsií byla skladována v roztoku RNAlater (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA) při teplotě -20° C nebo -80° C. Ze vzorků ledvinné tkáně byla pomocí soupravy RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) izolována vysoce kvalitní celková RNA, která byla následně eluována v 30ul vody prosté na RNázu. Čistota a koncentrace RNA byly stanoveny pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Pro syntézu komplementární DNA (cDNA) ze 2ug celkové RNA byla použita reverzní transkriptáza SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dle doporučení výrobce. Před reverzní transkripcí byla RNA ošetřena DNázou, tak aby následně syntetizovaná cDNA nebyla kontaminovaná genomovou DNA. Profily genové exprese 11 vybraných genů asociovaných s tolerancí či rejekcí (*GZMB*, *PRF1*, *CD247*, *FOXP3*, *TCA1M* (*TOAG-1*,

C3orf23), *MAN1A1*, *TLR5*, *MS4A1*, *CD79B*, *TCL1A*, *TMEM176B*) byly stanoveny pomocí kvantitativní real-time RT-PCR za použití metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$ pro relativní kvantifikaci genové exprese (relative quantity RQ, qRT-PCR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)). Kvantifikace mRNA byla provedena v triplicátech pomocí expresní eseje TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) a TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) na přístroji Prism 7900 HT Sequence Detection system (Applied Biosystems). Pro analýzu dat byl použit RQ Manager 1.2. software (Applied Biosystems).

Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí softwarů GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), BMDP PC-90 (BMDP Statistical Software Inc., Los Angeles, CA, USA) a SPSS 20 (IBM Corporation, Somers, NY). Klinické charakteristiky skupin pacientů byly porovnávány pomocí testu Mann-Whitney či Kruskal-Wallis podle rozložení dat (testování normality testem Shapiro-Wilk) u kontinuálních proměnných a χ^2 testem u kategorických proměnných. Pro porovnání počtů buněk a RQ mRNA u jednotlivých skupin pacientů byla použita logaritmická transformace a parametrické testování pomocí ANOVA pro opakovaná měření s Bonferroniho korekcí či s porovnáním dvou časových bodů uvnitř skupiny nebo gama regrese a zobecněný smíšený lineární model pro opakovaná měření s ajdustací. Pro korelaci klinických a cytometrických dat byl použit Spearmanův korelační koeficient. Data byla vyjádřena jako medián [min; max], absolutní počty (n), medián a interkvartilové rozpětí, odhadnuté marginální průměry \pm SEM. Rozdíly byly uvažovány jako statisticky signifikantní při $P < 0,05$. Použité statistické metody jsou podrobněji popsány v originálních zněních jednotlivých publikací.

4. VÝSLEDKY

4.1. Vliv indukční imunosuprese na regulační T lymfocyty

Úvod

Předpokládá se, že regulační T lymfocyty (Treg) snižují aloimunitní odpověď. Cílem této otevřené prospektivní studie bylo zhodnotit efekt různé indukční léčby na Treg v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny a analyzovat asociaci počtů těchto buněk s krátkodobými výsledky transplantace.

Metody

Počty CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg a CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ efektorových T lymfocytů (Teff) v periferní krvi byly stanovovány pomocí průtokové cytometrie u 71 prospektivně sledovaných příjemců ledvinného štěpu 0., 7., 14., 21., 28., 60. a 90. den po transplantaci. Pacienti byli léčeni trojkombinací imunosupresivní terapie s CNI s indukcí rATG (n=28), basiliximabem (anti-CD25 mAb, n=18) nebo bez indukce (n=25). Data z průtokové cytometrie byla korelována s incidencí rejekce.

Výsledky

V porovnání s pacienty léčených bez indukce, došlo ve skupině s indukcí rATG k expanzi CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ v rámci populace CD4⁺ T buněk ve všech sledovaných časech od 14. dne ($P<0.001$). U pacientů léčených basiliximabem došlo v porovnání s pacienty bez indukce v období 7. až 60. den po transplantaci k signifikantnímu poklesu v počtech CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg ($P<0.001$) a současně k přechodnému objevení CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ buněčné populace. Biopstický potvrzená akutní rejekce se vyskytla u 16,7% pacientů bez indukce, 10,7% pacientů léčených rATG a u 11,1% pacientů léčených basiliximabem. U pacientů bez rejekce ve skupině s basiliximabem byl v potransplantačním období pozorován vyšší poměr CD4⁺FoxP3⁺ Treg / Teff.

Závěr a shrnutí studie

V této prospektivní studii jsme ukázali, že indukční léčba rATG byla asociována s expanzí CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulačních buněk a že léčba basiliximabem vedla k přechodnému objevení CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ buněk při současném přechodném vymizení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Pacienti léčení indukční imunosupresivní léčbou měli nižší výskyt rejekcí v porovnání s pacienty bez indukce. Trvale vyšší poměr CD4⁺FoxP3⁺/Teff byl asociovaný s nepřítomností rejekce po indukcí basiliximabem. Tyto nálezy naznačují možné další mechanismy podílející se na protirejekčním působení rATG a basiliximabu.

4.2. Vliv indukční imunosuprese na expresi genů asociovaných s tolerancí a rejekcí

Úvod

Indukční terapie může zlepšit výsledky renální transplantace, ale jen málo je známo o mechanismech zodpovědných za její efekt. Cílem této studie bylo zhodnotit efekt různé indukční léčby na expresi genů asociovaných s tolerancí či rejekcí a počty lymfocytárních subpopulací v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny.

Metody

V periferní krvi 60 příjemců transplantované ledviny byla prospektivně monitorována relativní množství (RQ) mRNA genů asociovaných s tolerancí nebo rejekcí (*CD247*, *GZMB*, *PRF1*, *FOXP3*, *MAN1A1*, *TCAIM*, a *TLR5*) a lymfocytární subpopulace ($CD3^+$, $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocyty, $CD4^+FoxP3^+$ Treg a NK buňky) před transplantací a 7., 14., 21., 28., 60., 90. den a 6 a 12 měsíců po transplantaci. Protože basiliximab může vést k down-regulaci znaku CD25 (Vondran *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009) nebo interferovat s některými klony anti-CD25 mAb užívaných pro průtokovou cytometrii (Abadja *et al.*, 2010), byly v této studii Treg definovány jako $CD4^+FoxP3^+$. Pacienti byli léčeni trojkombinační imunosupresí založené na CNI a indukci rATG (n=24) či basiliximabem (n=17) nebo bez indukce (n=19). Pro statistickou analýzu byl použit zobecněný smíšený lineární model pro opakovaná měření s adjustací na rejekci, věk dárce a příjemce a opožděný rozvoj funkce.

Výsledky

Indukční léčba rATG vedla k depleci všech sledovaných T buněčných subpopulací a NK buněk během 7 dní po podání. Následovala pomalá repopulace během 12-měsíčního sledování. Stejně tak byl po rATG pozorován pokles hladin exprese genů *CD247*, *FOXP3*, *GZMB* a *PRF1* během 7 dní po transplantaci s následným vzestupem směrem k předtransplantačním hodnotám. Ve skupině s indukci basiliximabem byly pozorovány vyšší exprese genů *CD247*, *GZMB*, *FOXP3* a *TCAIM* a vyšší počty $CD4^+FoxP3^+$ Treg než ve skupině bez indukce. Ve skupině s indukční léčbou rATG byly pozorovány vyšší exprese genů *MAN1A1* a *TLR5*, zatímco exprese genu *TCAIM* byly v této skupině nižší v porovnání se skupinou pacientů bez indukce.

Závěr a shrnutí studie

V této otevřené prospektivní studii byla indukční léčba rATG krátce po transplantaci spojena s poklesem transkriptů asociovaných s T a NK buňkami a s up-regulací dvou transkriptů asociovaných s rejekcí (*MAN1A1* a *TLR5*). Vyšší exprese rejekčních genů, které jsou exprimovány i jinými buňkami než jsou lymfocyty podléhající depleci rATG, mohou ve skupině s rATG léčbou odrážet již předtransplantačně zvýšené riziko rejekce u těchto pacientů. Indukční léčba basiliximabem byla asociována se zvýšením absolutních počtů $CD4^+FoxP3^+$ regulačních T buněk a vyšší hladinou exprese genů dvou genů asociovaných s tolerancí, *FOXP3* a *TCAIM*, což může naznačovat protektivní potenciál léčby basiliximabem.

4.3. Subpopulace monocytů po transplantaci ledviny

Úvod

Monocyty představují heterogenní populaci buněk dále rozdělenou podle stupně exprese membránových antigenů/znaků. Prozánětlivá (intermediální/neklasická) subpopulace monocytů je definována expresí znaku CD16. Zatímco znak CD163 se zdá být charakteristicky preferenčně exprimován imunosupresivními monocyty. Cílem naší studie bylo monitorovat změny v periferních subpopulacích monocytů v časné fázi po transplantaci ledviny s ohledem na různé použité imunosupresivní režimy.

Metody

V periferní krvi 71 prospektivně sledovaných příjemců ledvinného štěpu a 20 zdravých dobrovolníků byly monitorovány subpopulace monocytů pomocí průtokové cytometrie. Pacientům byly odebírány vzorky krve před transplantací a 7., 14., 21., 28., 60. a 90. den a 6 a 12 měsíců po transplantaci. Pacienti byli léčeni trojkombinací imunosupresivní terapie s CNI a indukcí rATG (n=28), basiliximabem (n=18) nebo bez indukce (n=25). Pro *in vitro* experiment byly použity izolované PBMC, které byly stimulovány různými koncentracemi rATG, basiliximabu nebo methylprednisolonu. Zastoupení CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů bylo hodnoceno průtokovou cytometrií před stimulací a v časových odstupech po stimulaci (0, 3, 6, 24, 48 a 72 hod).

Výsledky

Fenotypy monocytů zastoupené v periferní krvi byly analyzovány průtokovou cytometrií v definovaných časech. Relativní počty periferních CD14⁺CD16⁺ monocytů se snížily okamžitě po transplantaci a indukční léčba basiliximabem částečně oslabila tento trend. Počty CD14⁺CD16⁺ monocytů se přiblížily k bazálním hodnotám dva měsíce po transplantaci. Relativní počty CD14⁺CD163⁺ monocytů byly přechodně zvýšeny krátce po transplantaci a zůstaly vyšší během prvního měsíce po transplantaci u většiny pacientů. U pacientů léčených rATG indukcí byla expanze CD14⁺CD163⁺ opožděna, ale trvala déle. *In vitro* experimenty ukázaly přímý efekt rATG a methylprednisolonu na expresi molekul CD16 a CD163, zatímco basiliximab fenotyp kultivovaných monocytů neovlivnil.

Závěr a shrnutí studie

Z našich výsledků usuzujeme, že transplantace ledviny je spojena se změnou monocytárních subpopulací CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ a je částečně ovlivněna použitým imunosupresivním režimem. Počet periferních CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů by se mohl stát jedním z potenciálně perspektivních ukazatelů ke zhodnocení imunitní odpovědi u pacientů po transplantaci ledviny. Indukce imunosupresivních CD14⁺CD163⁺ monocytů a potlačení prozánětlivých intermediálních/neklasických CD14⁺CD16⁺ monocytů by mohla hrát protektivní úlohu v časné fázi po transplantaci ledviny.

4.4. Biomarkery tolerance spojené s funkcí B lymfocytů

Úvod

Nedávno byly identifikovány tzv. molekulární podpisy ("molecular signatures") u pacientů s operační tolerancí s dlouhodobě fungujícím ledvinným štěpem bez nutnosti imunosupresivní léčby. Zatím je ale jen málo známo o expresi těchto genů asociovaných s tolerancí u pacientů se stabilní funkcí štěpu, kteří setrvávají na imunosupresivní léčbě. Tato práce byla úplně první, která validovala pozorování od pacientů s operační tolerancí (bez imunosupresivní léčby) v prospektivní kohortě nemocných léčených standardní imunosupresí.

Metody

V této prospektivní studii byly v periferní krvi měřeny expresní profily osmi vybraných genů rozdílně exprimovaných v krvi pacientů s operační tolerancí (*MS4A1*, *CD79B*, *TCL1A*, *TMEM176B*, *FOXP3*, *TCAIM* (dříve *TOAG-1*), *MAN1A1*, a *TLR5*) a počty CD45⁺CD19⁺CD3⁻ B lymfocytů u 67 příjemců transplantované ledviny před transplantací a 7., 14., 21., 28., 60. a 90. den a 6 a 12 měsíců po transplantaci. Expresse těchto genů byla dále hodnocena v renální tkáni získané biopsií štěpů. Expresní profily a počty B lymfocytů byly porovnány mezi skupinami pacientů rozdělených dle biotických nálezů během jednorozhodného sledování: s akutní rejekcí (klinickou či subklinickou, n=14), s hraničními změnami (n=20) a bez rejekce (n=33). Pro statistickou analýzu longitudinálních dat byl použit zobecněný smíšený lineární model pro opakovaná měření s gama regresí a s adjustací na použitou indukční terapii; pro analýzu dat z biopsií byl použit Kruskal-Wallisův test.

Výsledky

V průběhu sledování byly pozorovány signifikantně vyšší počty periferních B lymfocytů u pacientů bez rejekce a pacientů s hraničními změnami v porovnání s pacienty s rejekcí. Expresse genů *MS4A1* (CD20), *TCL1A*, *CD79B*, *TCAIM* a *FOXP3* byly signifikantně vyšší u pacientů bez rejekce a s hraničními změnami v porovnání se skupinou s rejekcí. Nejvyšší rozdíly byly pozorovány během prvních 3 měsíců. Naopak *TMEM176B* (*TORID*) byl up-regulován ve skupině s rejekcí. Ve štěpech byly nejvyšší exprese *TCAIM* pozorovány u pacientů bez rejekce.

Závěr a shrnutí studie

Naše pozorování naznačují, že „B buněčný podpis“ známý od pacientů po transplantaci ledviny s operační tolerancí bez nutnosti imunosupresivní léčby, je také spojen s kontrolovanou aloimunitní odpovědí u pacientů po transplantaci ledviny na standardní imunosupresi. Pokud je nám známo, je tato prospektivní observační studie první, která validovala asociaci a domnělou protektivní roli genů spojených s tolerancí a funkcí B lymfocytů u pacientů po transplantaci ledviny, kteří jsou ještě léčeni standardní imunosupresivní terapií. Zda tato pozorování budou tvořit základ pro jednodušší a bezpečnější minimalizační (nebo eliminační) strategii léčby bude moci být zodpovězeno po provedení prospektivních intervenčních studií založených na biomarkerech.

5. DISKUZE

Pokud je nám známo, jako první jsme hodnotili a prokázali vliv různých indukčních imunosupresivních léků na počty regulačních T lymfocytů a expresi molekulárních markerů asociovaných s rejekcí či tolerancí u příjemců transplantované ledviny *in vivo*. Také jsme jako první validovali asociaci a předpokládanou protektivní roli genů asociovaných s tolerancí a s funkcí B lymfocytů u pacientů po transplantaci ledviny, kteří byli léčeni standardní imunosupresivní terapií. Dále jsme ukázali, že v časně fázi po transplantaci ledviny dochází ke změnám v periferních subpopulacích monocytů také s podílem použitých imunosupresivních režimů. Výsledky naší studie prokázaly, že pacienti léčení rATG a basiliximabem měli sníženou incidenci akutní rejekce v prvních 3 měsících po transplantaci.

V našich studiích jsme zjistili, že po indukci rATG došlo v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny k hluboké depleci T lymfocytů a NK buněk a k poklesu exprese genů výhradně exprimovaných těmito buňkami. Zároveň však došlo k výrazné expanzi Treg v CD4⁺ kompartmentu. Indukce rATG byla navíc krátce po transplantaci spojena s přechodnou up-regulací dvou transkriptů asociovaných s rejekcí (*MAN1A1* a *TLR5*).

Na dávce závislý depleční účinek rATG na T a NK lymfocyty byl zdokumentován v řadě studií (Hadaya *et al.*, 2010; Kho *et al.*, 2012; Sageshima *et al.*, 2011; Sewgobind *et al.*, 2009; Vacher-Coponat *et al.*, 2006), ale velmi málo je známo o změnách hladin transkriptů vlivem rATG léčby (Simon *et al.*, 2003). V naší studii jsme po indukci rATG popsali časně po transplantaci hluboký pokles genů asociovaných s tolerancí či s rejekcí (Iwase *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2001; Louis *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2003), které jsou výhradně exprimované T a NK buňkami (*CD247*, *GZMB*, *PRF1* a *FOXP3*). Hluboký pokles expresí těchto genů následovaný postupným vzestupem směrem k předtransplantačním hodnotám odpovídal depleci a repulaci zmíněných buněčných populací.

Po indukci rATG jsme dále pozorovali přechodnou up-regulaci genů *MAN1A1* a *TLR5*. Studie konsorcia The Indices of Tolerance identifikovala řadu markerů, které umožnily u příjemců transplantované ledviny spolehlivě rozlišit pacienty s operační tolerancí bez potřeby imunosuprese a pacienty s chronickou rejekcí (Sagoo *et al.*, 2010). U pacientů s operační tolerancí byla exprese *TLR5* (jako jednoho z 10 odlišně exprimovaných genů) nižší a podíl *FOXP3* k α -1,2-manozidáze vyšší v porovnání s pacienty s chronickou rejekcí (Sagoo *et al.*, 2010). Pacienti, kteří prodělali chorobu štěpu proti hostiteli, měli zvýšenou expresi *TLR5* v periferní krvi a léčba přenosem Treg redukovala tuto expresi a předešla chorobě (Sawitzki *et al.*, 2014). Přestože byly rozdíly v expresi *TLR5* v naší studii statisticky signifikantní, klinická významnost tohoto nálezu je sporná. Nicméně, vyšší exprese rejekčních genů ve skupině s indukci rATG by mohl odrážet již předtransplantačně zvýšené riziko rejekce u těchto pacientů (pacienti s PRA \geq 50%).

V naší studii došlo po indukční léčbě rATG k vzestupu relativních počtů CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg *in vivo*, což naznačuje expanzi indukovanou rATG, popsanou dříve *in vitro* Lopezovou *et al.* (Lopez

et al., 2006) a Fengem *et al.* (Feng *et al.*, 2008) a je konzistentní s prací Gurkana *et al.* (Gurkan *et al.*, 2010), který u T lymfocytů s Treg fenotypem popsal jak periferní expanzi, tak novou migraci z thymu navozenou podáváním rATG. Studie jak *in vitro* (Feng *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2006; Sewgobind *et al.*, 2010) tak *in vivo* (Sewgobind *et al.*, 2009) prokázaly, že rATG ovlivnil počty CD4⁺CD25⁺ Treg nikoliv však jejich funkci.

U pacientů s indukční léčbou basiliximabem jsme přechodně detekovali populaci buněk CD4⁺CD25^{low}/FoxP3⁺, nepřítomnou před transplantací. Současně byly CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg prakticky nedetekovatelné či výrazně snížené oproti předtransplantačním hodnotám. Po indukční léčbě basiliximabem byla popsána snížená hustota exprese CD25 molekuly mechanismem internalizace nebo odštěpení (Vondran *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). *In vitro* studie však ukázaly, že basiliximab může bránit detekci CD25 znaku pomocí anti-CD25 mAb využívaných v průtokové cytometrii, které se vážou na stejný epitop molekuly CD25 (Vincenti *et al.*, 1997). Šest z osmi běžně používaných klonů anti-CD25 mAb *in vitro* interferovalo s basiliximabem (Abadja *et al.*, 2010). Naše doplňující *in vivo* studie ukázala, že žádný ze třech použitých klonů se nevázal na cirkulující Treg v přítomnosti basiliximabu (Sekerikova *et al.*, 2012). Pozorování CD4⁺CD25^{low}/FoxP3⁺ populace současně s vymizením CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg bylo tedy velmi pravděpodobně zapříčiněno kompeticí basiliximabu a anti-CD25 mAb použitou pro detekci buněk průtokovou cytometrií. Vzhledem k těmto nálezům jsme dále Treg definovali jako CD4⁺FoxP3⁺. Absolutní počty CD4⁺FoxP3⁺Treg byly po indukci Basiliximabem přechodně zvýšené což je v souladu s nálezy Bluestone *et al.* (Bluestone *et al.*, 2008). Jiné práce však tento nález nepotvrdily (Bouvy *et al.*, 2014; de Goer de Herve *et al.*, 2010).

Léčba basiliximabem byla dále spojená se zvýšenou expresí genů *FOXP3* a *TCAIM*. *TCAIM* byl vysoce exprimován během experimentálního navození a trvání tolerance k dárcovským aloantigenům *in vivo*, což vedlo k přijetí štěpů ledviny u potkanů a srdce u myší; jeho exprese poklesla v periferní krvi a ve štěpu před tím, než došlo k rejekci štěpu (Sawitzki *et al.*, 2007). Tato down-regulace nastala v buňkách infiltrujících štěp a po T buněčné aktivaci *in vitro* (Sawitzki *et al.*, 2007). Vzestup exprese mRNA *TCAIM* byl popsán také po podání regulačních makrofágů pacientům před transplantací ledviny od žijícího dárce (Hutchinson *et al.*, 2011). V potkaním modelu transplantace ledviny byla exprese *TCAIM* dramaticky redukována u neléčených příjemců a u příjemců po přenosu donor-specifických paměťových buněk (Siepert *et al.*, 2012). Nedávno bylo prokázáno, že protein *TCAIM* inhiboval spontánní vývoj paměťových a efektorových T lymfocytů, které jsou nezbytné pro rozvoj rejekce alogenního štěpu (Schumann *et al.*, 2014). *FOXP3* je hlavní transkripční faktor Treg (Bluestone, 2011). Hladiny jeho transkriptů byly vyšší u pacientů s operační tolerancí nebo stabilní funkcí štěpu na imunosupresi v porovnání s pacienty s chronickou rejekcí (Iwase *et al.*, 2011; Louis *et al.*, 2006). Vyšší exprese *FOXP3* a *TCAIM* v naší studii spolu s vyššími počty Treg po indukci basiliximabem mohou naznačovat protektivní potenciál této léčby.

Předpokládá se, že nerovnováha v poměru Treg/Teff může mít vliv na osud štěpu (Zheng *et al.*, 2003). V naší studii jsme tuto hypotézu potvrdili pouze u pacientů po indukci basiliximabem, což může být vysvětleno faktem, že všechny akutní rejekce v rATG skupině byly zprostředkované protilátkami. Naše předchozí výzkumy naznačují rozdíl v imunitní regulaci ABMR a TCMR (Viklicky *et al.*, 2010). Podobně studie metodou microarray odhalily kvantitativně specifické exprese molekul a skupiny transkriptů specifických pro patogenezi T lymfocyty a protilátkami zprostředkované rejekce transplantované ledviny (Halloran *et al.*, 2010). V naší studii jsme pozorovali trend k vyšším předtransplantačním relativním počtům Teff u pacientů bez indukce, kteří prodělali těžkou steroid-rezistentní rejekci. Navzdory malému počtu pacientů může toto pozorování podporovat nálezy jiné práce, která ukázala, že vyšší předtransplantační hodnoty Teff byly asociovány s nepříznivými výsledky (Egawa *et al.*, 2009).

Výsledky naší studie monocytárních subpopulací u pacientů po transplantaci ledviny svědčí pro to, že u těchto pacientů dochází po transplantaci k posunu v zastoupení CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů a že jsou tyto změny částečně ovlivněny použitým imunosupresivním režimem. Během prvního týdne po transplantaci bylo zastoupení intermediálních/neklasických CD14⁺CD16⁺ sníženo, což by mohlo být způsobeno jejich přesunem do štěpu nebo jejich selektivní delecí. Ta se zdá být více pravděpodobná, protože je tato subpopulace stárnoucí (Merino *et al.*), což nepřímo naznačuje, že může být více citlivá k agresivnímu prostředí „cytokinové bouře“ spojené s ischemicko-reperfučním poškozením transplantované ledviny. Počáteční počty CD14⁺CD16⁺ monocytů před transplantací byly vyšší než u zdravých kontrol, což odráží konečné stádium onemocnění ledvin (Rogacev *et al.*).

Dále jsme pozorovali vliv různých léčebných imunosupresivních režimů na počty monocytárních subpopulací. U pacientů bez indukce a pacientů s indukcí rATG došlo k signifikantnímu poklesu počtu CD14⁺CD16⁺ monocytů během prvního týdne po transplantaci, zatímco u pacientů léčených basiliximabem došlo jen k mírnému poklesu dva týdny po transplantaci. V *in vitro* experimentu jsme prokázali přímý vliv rATG na pokles CD14⁺CD16⁺ monocytů, basiliximab tuto subpopulaci *in vitro* neovlivnil. Vysvětlení této odlišné buněčné odpovědi může spočívat v různých mechanismech působení rATG a basiliximabu. Polyklonální rATG vede k okamžité, na T lymfocyty cílené, depleci se zřejmým vlivem i na další imunitní buňky, zatímco basiliximab se váže na α -řetězec IL-2R (CD25) na povrchu aktivovaných T lymfocytů, které pak nejsou schopny navázat IL-2. Léčba basiliximabem ovlivňuje především IL-2 a T lymfocyty zprostředkovanou imunitní odpověď a pravděpodobně nemá přímý vliv na monocyty (Vincenti, 2005).

Časné zvýšení exprese CD163 znaku může být výsledkem léčby kortikosteroidy, které jsou součástí standardních imunosupresivních režimů. Indukce exprese CD163 vlivem glukokortikoidů již byla dříve popsána (Maniecki *et al.*, 2006) a naše *in vitro* data potvrdila časnou expresi CD163 na monocytech v odpovědi na methylprednisolon. Kromě zvýšení počtu monocytů exprimujících CD163 vedla stimulace methylprednisolonom také ke zvýšení hustoty exprese CD163 na buněčném

povrchu. Opožděné navození exprese CD163 u pacientů léčených rATG bylo překvapivě spojeno s prodloužením exprese tohoto znaku a může být důsledkem regulace jinými indukovanými buňkami, protože trvalo 3 měsíce po posledním podání rATG. Počáteční počty CD14⁺CD163⁺ monocytů se nelišily od hodnot u zdravých kontrol. Současně se vzestupem počtů CD14⁺CD163⁺ subpopulace jsme pozorovali snížení celkových krevních monocytů jeden týden po transplantaci u pacientů léčených rATG. Bylo prokázáno, že rATG indukuje apoptózu monocytů (Grulich *et al.*, 2009). Dá se předpokládat vliv rATG na funkci monocytů včetně exprese povrchových markerů a produkce cytokinů.

V naší studii jsme dále s ohledem na osud štěpu během jednoročního sledování pacientů po transplantaci ledviny léčených standardní imunosupresí hodnotili počty periferních B lymfocytů a exprese genů, které byly rozdílně exprimovány v krvi pacientů s operační tolerancí. Z našich dat vyplývá důkaz o zvýšené imunoregulaci u pacientů bez rejekce v porovnání s pacienty s akutní rejekcí. Příjemci štěpu, kteří neprodělali akutní rejekci během prvního roku po transplantaci, měli trvale zvýšené exprese *FOXP3* a stejně tak poměr *FOXP3/MAN1A1* v periferní krvi. Podobně byla u těchto pacientů v průběhu sledování konstantně zvýšená exprese *TCA1M*. Zároveň byla exprese tohoto genu snížena během akutní rejekce v časném potransplantačním období snížena, což naznačuje, že by úloha tohoto makeru měla být dále klinicky validována.

Nedávno bylo ukázáno, že složení B lymfocytárního kompartmentu je určující pro osud štěpu; naivní a transitorní B lymfocyty byly asociovány s dlouhodobou funkcí štěpu a operační tolerancí, zatímco paměťové B lymfocyty s omezeným přežitím štěpu a rejekcí (Heidt *et al.*, 2011; Kirk *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010). My jsme pozorovali vyšší počty B lymfocytů u pacientů bez rejekce a s hraničními změnami v porovnání s pacienty s akutní rejekcí. Dále jsme potvrdili klinickou důležitost markerů operační tolerance spojených s funkcí B lymfocytů v průběhu jednoho roku po transplantaci u pacientů léčených standardní imunosupresí. Ve studii konsorcia Indices of Tolerance (Sagoo *et al.*, 2010) byly pomocí microarray identifikovány geny *CD79B*, *MS4A1 (CD20)* a *TCLA1* mezi celkem 10 geny, které nejlépe odlišují pacienty s operační tolerancí od ostatních skupin pacientů. Transkripty genů *TCLA1*, *CD79B*, *MS4A1* byly zvýšeně exprimovány v krvi pacientů s operační tolerancí bez imunosupresivní léčby v porovnání s pacienty se stabilní funkcí ledvinného štěpu (Newell *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010) či s pacienty s intersticiální fibrózou a tubulární atrofií (Brouard *et al.*, 2007). Všechny tři výše zmíněné široce citované studie (Brouard *et al.*, 2007; Newell *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010) hodnotily pacienty s operační tolerancí s dlouhodobě fungujícími štěpy, ale analýza tolerantních markerů u pacientů v časném potransplantačním období, kdy jsou pacienti ještě léčeni vysokodávkovou imunosupresí a během akutní rejekce zatím chyběla. Naše prospektivní studie tak nabízí nový pohled na problematiku tolerance.

V naší studii jsme pozorovali vyšší exprese genů *CD79B*, *MS4A1* a *TCLA1* v periferní krvi pacientů s dobrým osudem štěpu během období sledování. Gen *CD79B*, kóduje transmembránový protein, který je součástí komplexu antigenního receptoru B lymfocytů. Nejvýraznější rozdíly

v genové expresi byly u genů *MS4A1* a *TCL1A*. *MS4A1* (CD20) je transmembránový protein exprimovaný na zralých i nezralých B lymfocytech. Fyziologická exprese onkoproteinu *TCL1A* (T-cell leukemia/lymphoma 1A) je limitovaná na časná vývojová stádia buněk (včetně imunitních) a jeho exprese byla signifikantně zvýšená u naivních B lymfocytů a lymfocytů s prodlouženým přežitím (Noguchi *et al.*, 2007; Tabrizi *et al.*, 2009). Exprese tohoto proteinu byla nejvyšší u nezralých B lymfocytů a nízká nebo zcela chybějící u zralých B lymfocytů (Kuraishy *et al.*, 2007). V naší studii byly v periferní krvi několik měsíců po transplantaci up-regulovány geny asociované s naivními nezralými B lymfocyty.

Rok po publikování naší práce ukazující asociaci markerů tolerance spojených s funkcí B lymfocytů s dobrým osudem štěpu potvrdil naše závěry Heidt *et al.*, kteří vyšetřili exprese stejných markerů u nemocných s probíhající rejekcí (Heidt *et al.*, 2014). Je tak možno soudit, že exprese *TCL1* a vyšší zastoupení transientních B buněk v periférii představují prognosticky příznivý fenotyp. Tito nemocní by pak nemuseli být vystaveni standardní imunopresi, která je pro ně vlastně nadměrná.

Domníváme se, že nové biomarkery tolerance představují naději pro budoucí potransplantační sledování, ale jejich užitečnost musí být validována v prospektivních klinických studiích.

6. ZÁVĚRY

1. Indukční léčba rATG byla asociována s expanzí CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulačních buněk. Léčba basiliximabem vedla k přechodnému objevení se CD4⁺CD25^{low}-FoxP3⁺ buněk při současném přechodném vymizení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Pacienti léčení indukční imunosupresivní léčbou měli nižší výskyt rejekcí v porovnání s pacienty bez indukce. Trvale vyšší poměr CD4⁺FoxP3⁺ Treg k CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ Teff byl asociovaný s nepřítomností rejekce po indukci basiliximabem. Tyto nálezy naznačují možné další mechanismy podílející se na protirejčném působení rATG a basiliximabu.
2. Indukční léčba rATG byla krátce po transplantaci spojena s poklesem T a NK buněk a transkriptů asociovaných s T a NK buňkami a s up-regulací dvou transkriptů asociovaných s rejekcí (*MAN1A1* a *TLR5*). Vyšší exprese těchto dvou rejekčních genů ve skupině s rATG léčbou mohou odrážet již předtransplatačně zvýšené riziko rejekce u těchto pacientů. Indukční léčba basiliximabem byla asociována se zvýšením absolutních počtů Treg a zvýšenou hladinou exprese genů *FOXP3* a *TCAIM*, což může naznačovat protektivní potenciál léčby basiliximabem.
3. Transplantace ledviny je spojena se změnou monocytárních subpopulací CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ a je částečně ovlivněna použitým imunosupresivním režimem. Počet periferních CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů by se mohl stát jedním z potenciálně perspektivních ukazatelů ke zhodnocení imunitní odpovědi u pacientů po transplantaci ledviny. Indukce imunosupresivních CD14⁺CD163⁺ monocytů a potlačení prozánětlivých CD14⁺CD16⁺ monocytů by mohla hrát protektivní úlohu v časně fázi po transplantaci ledviny.
4. V průběhu sledování byly u pacientů bez rejekce a pacientů s hraničními změnami pozorovány signifikantně vyšší počty periferních B lymfocytů a exprese genů spojených s funkcí B lymfocytů (*MS4A1* (CD20), *TCL1A*, *CD79B*) a dále *TCAIM* a *FOXP3* v porovnání s pacienty s rejekcí. Ve štěpech byly nejvyšší exprese *TCAIM* pozorovány u pacientů bez rejekce. Naše pozorování naznačují, že „B buněčný podpis“ známý od pacientů po transplantaci ledviny s operační tolerancí bez nutnosti imunosupresivní léčby, je také spojen s kontrolovanou aloimunitní odpovědí u pacientů po transplantaci ledviny na běžné imunosupresivní léčbě.

7. CONCLUSIONS

1. The rATG induction therapy was associated with the expansion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. Basiliximab caused a transient appearance of CD4⁺CD25^{low}/FoxP3⁺ cells and concurrently a transient disappearance of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Patients treated with induction therapy had lower incidence of rejection compared to patients with no induction. Sustained high CD4⁺FoxP3⁺ Treg / CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ Teff ratios were associated with absence of rejection after basiliximab induction. These findings suggest possible additional mechanisms participating on anti-rejection action of rATG and basiliximab.
2. The rATG induction therapy was associated with an intense reduction in all T cell type population and NK cells and profound decreases of T and NK cell-related transcripts and with the up-regulation of two rejection-associated transcripts (*MAN1A1A* and *TLR5*) in the early post-transplant period. Higher expression of these two rejection genes could reflect higher pre-transplant risk in these patients. Basiliximab induction was associated with increased absolute number of Treg cells, and increased expression of tolerance associated markers *FOXP3* and *TCAIM* which could indicate a protective potential of basiliximab.
3. Kidney transplantation is associated with modulation of CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺CD163⁺ monocyte subpopulations partially affected by an immunosuppressive regimen used. The number of peripheral CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺CD163⁺ monocytes might be one of new potentially perspective laboratory parameters to evaluate immune responses in kidney transplant recipients. The induction of immunosuppressive CD14⁺CD163⁺ monocytes and down-regulation of proinflammatory CD14⁺CD16⁺ monocytes might play a protective role in the early phase after kidney transplantation.
4. A significantly higher number of peripheral B cells and expressions of B-cell-related genes (*MS4A1*, *TCL1A*, *CD79B*), *TCAIM* and *FOXP3* were observed during follow-up in rejection-free patients and in patients with borderline changes as compared to rejection group. Highest intra-graft expression of *TCAIM* was observed in rejection-free patients. These observations suggest that “B-cell signatures”, known from drug-free tolerant patients without any immunosuppression, are also associated with controlled alloimmune response in kidney transplant recipients on standard immunosuppression therapy.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abadja F, Alamartine E, Berthoux F, *et al.* Quantification of circulating regulatory T cells by flow cytometry in kidney transplant patients after basiliximab induction therapy. *Transplantation* 2010; 89(3):366-368.
- Amico P. Evolution of graft survival in kidney transplantation: an analysis of the OPTN/UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2010;1-15.
- Ashton-Chess J, Giral M, Brouard S, *et al.* Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. *Transplantation* 2007; 84(10):1215-1219.
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172(4379):603-606.
- Bluestone JA. Mechanisms of tolerance. *Immunol Rev* 2011; 241(1):5-19.
- Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, *et al.* The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8(10):2086-2096.
- Bouvy AP, Klepper M, Kho MM, *et al.* The impact of induction therapy on the homeostasis and function of regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29(8):1587-1597.
- Brouard S, Mansfield E, Braud C, *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(39):15448-15453.
- de Goer de Herve MG, Gonzales E, Hendel-Chavez H, *et al.* CD25 appears non essential for human peripheral T(reg) maintenance in vivo. *PLoS One* 2010; 5(7):e11784.
- Dharnidharka VR, Stablein DM, Harmon WE. Post-transplant infections now exceed acute rejection as cause for hospitalization: a report of the NAPRTCS. *Am J Transplant* 2004; 4(3):384-389.
- Egawa H, Ozawa K, Takada Y, *et al.* Impact of preexisting circulating effector T cells on the outcome of ABO-incompatible adult LDLT. *Dig Dis Sci* 2009; 54(10):2253-2263.
- Elias N, Cosimi AB, Kawai T. Clinical trials for induction of renal allograft tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2015; 20(4):406-411.
- Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, *et al.* Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells in vitro. *Blood* 2008; 111(7):3675-3683.
- Girmanova E, Hrubá P, Viklický O. Circulating biomarkers of tolerance. *Transplant Rev (Orlando)* 2015; 29(2):68-72.
- Grulich C, Ziegler C, Finke J. Rabbit anti T-lymphocyte globulin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cell compartments and leukemia cells, while hematopoietic stem cells are apoptosis resistant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15(2):173-182.
- Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, *et al.* Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant* 2010; 10(9):2132-2141.
- Hadaya K, Avila Y, Valloton L, *et al.* Natural killer cell receptor--repertoire and functions after induction therapy by polyclonal rabbit anti-thymocyte globulin in unsensitized kidney transplant recipients. *Clin Immunol* 2010; 137(2):250-260.
- Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G, *et al.* The molecular phenotype of kidney transplants. *Am J Transplant* 2010; 10(10):2215-2222.
- Hasek M, Hrabá T, Benesová H, *et al.* [Immunologic considerations on embryonic parabiosis of duck and chick.]. *Ceskoslov Biol* 1955; 4(3):135-137.
- Heidt S, San Segundo D, Shankar S, *et al.* Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplantation* 2011; 92(1):1-9.

Heidt S, Vergunst M, Anholts JD, *et al.* B Cell Markers of Operational Tolerance Can Discriminate Acute Kidney Allograft Rejection From Stable Graft Function. *Transplantation* 2014.

Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, *et al.* Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol* 2011; 187(5):2072-2078.

Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, *et al.* Clinical significance of regulatory T-cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation. *Transplantation* 2011; 91(2):191-198.

Kho MM, Bouvy AP, Cadogan M, *et al.* The effect of low and ultra-low dosages Thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* 2012; 26(4):186-190.

Kirk AD, Turgeon NA, Iwakoshi NN. B cells and transplantation tolerance. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6(10):584-593.

Kuraishy AI, French SW, Sherman M, *et al.* TORC2 regulates germinal center repression of the TCL1 oncoprotein to promote B cell development and inhibit transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(24):10175-10180.

Li B, Hartono C, Ding R, *et al.* Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001; 344(13):947-954.

Lopez M, Clarkson MR, Albin M, *et al.* A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(10):2844-2853.

Louis S, Braudeau C, Giral M, *et al.* Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81(3):398-407.

Maniecki MB, Moller HJ, Moestrup SK, *et al.* CD163 positive subsets of blood dendritic cells: the scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes. *Immunobiology* 2006; 211(6-8):407-417.

Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, *et al.* Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008; 118(8):2845-2857.

Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, *et al.* Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7(2):309-319.

Medawar PB. The immunology of transplantation. *Harvey Lect* 1956;(Series 52):144-176.

Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, *et al.* Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J Immunol* 186(3):1809-1815.

Newell KA, Asare A, Kirk AD, *et al.* Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120(6):1836-1847.

Noguchi M, Ropars V, Roumestand C, *et al.* Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB J* 2007; 21(10):2273-2284.

Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, *et al.* CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 32(1):84-92.

Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6(4):736-746.

Sageshima J, Ciancio G, Guerra G, *et al.* Prolonged lymphocyte depletion by single-dose rabbit anti-thymocyte globulin and alemtuzumab in kidney transplantation. *Transpl Immunol* 2011; 25(2-3):104-111.

Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, *et al.* Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120(6):1848-1861.

Sawitzki B, Brunstein C, Meisel C, *et al.* Prevention of graft-versus-host disease by adoptive T regulatory therapy is associated with active repression of peripheral blood Toll-like receptor 5 mRNA expression. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20(2):173-182.

Sawitzki B, Bushell A, Steger U, *et al.* Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant* 2007; 7(5):1091-1102.

Sekerikova A, Brabcova E, Krystufkova E, *et al.* Basiliximab Treatment Interferes with Anti CD25 Monoclonal Antibodies Used for Flow Cytometry Detection of Tregs in Kidney Transplant Recipient. *Supplement to Transplantation* 2012; 94(10S):982-982.

Sewgobind VD, Kho MM, van der Laan LJ, *et al.* The effect of rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy on regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(5):1635-1644.

Sewgobind VD, van der Laan LJ, Kho MM, *et al.* Characterization of rabbit antithymocyte globulins-induced CD25+ regulatory T cells from cells of patients with end-stage renal disease. *Transplantation* 2010; 89(6):655-666.

Schumann J, Stanko K, Woertge S, *et al.* The mitochondrial protein TCAIM regulates activation of T cells and thereby promotes tolerance induction of allogeneic transplants. *Am J Transplant* 2014; 14(12):2723-2735.

Siepert A, Ahrlich S, Vogt K, *et al.* Permanent CNi treatment for prevention of renal allograft rejection in sensitized hosts can be replaced by regulatory T cells. *Am J Transplant* 2012; 12(9):2384-2394.

Simon T, Opelz G, Weimer R, *et al.* The effect of ATG on cytokine and cytotoxic T-lymphocyte gene expression in renal allograft recipients during the early post-transplant period. *Clin Transplant* 2003; 17(3):217-224.

Simon T, Opelz G, Wiesel M, *et al.* Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 2003; 3(9):1121-1127.

Tabrizi SJ, Niuro H, Masui M, *et al.* T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. *J Immunol* 2009; 182(3):1490-1499.

Vacher-Coponat H, Brunet C, Moal V, *et al.* Tacrolimus/mycophenolate mofetil improved natural killer lymphocyte reconstitution one year after kidney transplant by reference to cyclosporine/azathioprine. *Transplantation* 2006; 82(4):558-566.

Viklicky O, Hribova P, Volk HD, *et al.* Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(1):173-180.

Vincenti F. Current use and future trends in induction therapy. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2005; 16(4):506-513.

Vincenti F, Lantz M, Birnbaum J, *et al.* A phase I trial of humanized anti-interleukin 2 receptor antibody in renal transplantation. *Transplantation* 1997; 63(1):33-38.

Vondran FW, Timrott K, Tross J, *et al.* Impact of Basiliximab on regulatory T-cells early after kidney transplantation: down-regulation of CD25 by receptor modulation. *Transpl Int* 2010; 23(5):514-523.

Wang Z, Shi BY, Qian YY, *et al.* Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2009; 155(3):496-503.

Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M, *et al.* Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity* 2003; 19(4):503-514.

PUBLIKACE

Publikace, které jsou podkladem disertace

a) s impact factorem (IF)

- 1) Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I, Brabcova I, Girmanova E, Viklicky O.
Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy.
Nephrology Dialysis Transplantation. 2012 Jun;27(6):2576-82. IF 3.371
- 2) Viklicky O, Krystufkova E, Brabcova I., Sekerkova A, Wohlfahrt P, Hribova P, Urbanova M, Sawitzki B, Slatinska J, Striz I, Volk HD, Reinke P.
B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients.
Transplantation. 2013 Jan 15;95(1):148-54. IF 3.535
- 3) Sekerkova A, Krepsova E, Brabcova E, Slatinska J, Viklicky O, Lanska V, Striz I.
CD14+CD16+ and CD14+CD163+ monocyte subpopulations in kidney allograft transplantation.
BMC Immunology. 2014 Feb 6;15:4. IF 2.481
- 4) Krepsova E, Tycova I, Sekerkova A, Wohlfahrt P, Hrubá P, Striz I, Sawitzki B and Viklicky O.
Effect of induction therapy on the expression of molecular markers associated with rejection and tolerance.
BMC Nephrology. 2015 Aug 19;16:146. IF 1.690

b) bez IF

Kryštůfková E., Viklický O.
Biomarkery tolerance a rejekce po transplantaci ledviny.
Aktuality v nefrologii. 16, 1, 2010.