

## Využití transkriptomiky v molekulární patologii ledvinných štěpů

Mgr. Petra Hrubá, Ph.D. Transplantační laboratoř IKEM, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN v Praze

Jednou z hlavních příčin selhávání transplantovaných ledvin je odhojování štěpů (rejekce). Správná diagnostika typu a závažnosti rejekce (hraniční změny, T či B buňkami zprostředkovaná či smíšená) je klíčová pro volbu odpovídající léčby. Diagnostika typu rejekce je založena na semikvantitativním histopatologickém zhodnocení bioptického vzorku, některé histopatologické léze jsou však nespecifické a nález je pak nejednoznačný. V předkládané práci jsou tyto nejasné diagnózy (hraniční změny, vaskulární léze a C4d pozitivita u akomodace) vyšetřovány pomocí transkriptomických metod (microarray, RNA sekvenování), které mohou významně přispět ke zpřesnění diagnózy.

Hraniční změny představují velmi heterogenní diagnostický nález s nejasnou prognózou, a právě transkriptomické vyšetření metodou molekulárního mikroskopu umožňuje rozlišit rejekční a nerejekční fenotyp. Riziko selhání štěpu po nálezu hraničních změn je vyšší u pacientů, kteří dostali ledvinu od staršího dárce, kteří měli opožděnou funkci štěpu a u nichž byly hraniční změny diagnostikovány v indikační biopsii časně po transplantaci. V naší studii mělo 65 % biopsií s hraničními změnami negativní rejekční molekulární skóre v první i v následné biopsii. U části biopsií s pozitivním rejekčním molekulárním skóre došlo k jeho poklesu a u části zůstalo pozitivní i ve 3. měsíci. Nejvýznamnějším prediktorem molekulární rejekce ve 3. měsíci bylo vyšší molekulární skóre pro tubulitidu v indikační biopsii. Ukázali jsme, že tzv. izolovaná tubulitida, která až do konce roku 2019 dle Banfské klasifikace představovala podkategorii hraničních změn, má nižší expresi transkriptů asociovaných se zánětem (metodou RNA sekvenování a molekulárního mikroskopu). Nicméně i v rámci kategorie izolované tubulitidy jsme pomocí molekulárního mikroskopu identifikovali rejekční fenotypy, i když v menší míře než u tubulitidy, s intersticiálním zánětem. Analýzou transkriptomu jsme také potvrdili vyšší aktivaci imunitních a zánětlivých transkriptů u hraničních změn diagnostikovaných v indikační biopsii v porovnání se subklinickými hraničními změnami zjištěnými v protokolární biopsii a identifikovali jsme potenciální markery zhoršení funkce štěpu po této diagnóze (vyšší věk dárce a exprese makrofágového receptoru *CLEC5A*). Vliv marginálního dárce na osud ledviny po diagnóze hraničních změn v časně indikační biopsii jsme potvrdili i na molekulární úrovni. Pacienti, kteří dostali ledvinu od marginálního dárce, měli významně zvýšenou expresi transkriptů asociovaných s akutním poškozením ledvin a zánětlivou odpovědí. Naše výsledky tedy podporují používání depleční indukční léčby Thymoglobulinem u příjemců štěpů od marginálních dárců.

U pacientů po ABO inkompatibilní transplantaci ledviny s akomodací (aktivace komplementu hemaglutininy, která nevede k poškození štěpu) jsme zjistili nižší expresi několika epiteliálních transportérů a metalotioneinů v porovnání s pacienty se znaky subklinické protilátkami zprostředkované rejekce. Pacienti s akomodací měli vyšší expresi *CD59*, což zřejmě představuje ochranný mechanismus před poškozením tkáně komplementem.

V další práci jsme ukázali, že tzv. izolovaná léze (celulární vaskulární rejekce bez tubulointersticiálního nálezu) představuje podle molekulárního vyšetření nerejekční fenotyp.

Výsledky všech výše uvedených studií podporují začlenění transkriptomických metod (zejména vyšetření molekulárním mikroskopem) do diagnostického procesu, kde se stanou významným doplňkem histopatologického nálezu a vyšetření donor specifických protilátek.

### Tři nejvýznamnější publikace

Hrubá P, Brabcova I, Gueler F, Krejčík Z, Stranecký V, Svobodová E et al. Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney Int* 2015;88(4):785-795.

Hrubá P, Madill-Thomsen K, Macková M, Klema J, Malusková J, Voska L et al. Molecular patterns of isolated tubulitis differ from tubulitis with interstitial inflammation in early indication biopsies of kidney allografts. *Sci Rep* 2020;10(1):22220.

Hrubá P, Krejčík Z, Stranecký V, Malusková J, Slatinská J, Gueler F et al. Molecular Patterns Discriminate Accommodation and Subclinical Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Transplantation* 2019;103(5):909-917.

