

Ocena skuteczności trójlekowego schematu immunosupresji w zapobieganiu wytwarzania swoistych przeciwciał anti-HLA (ang. donor-specific antibodies; DSA) u dzieci po transplantacji nerki- badanie retrospektywne i prospektywne.

Streszczenie

O odległych losach przeszczepu nerki decyduje kilka nakładających się czynników, niemniej jednym z podstawowych jest przewlekłe odrzucanie humoralne (ang. *chronic humoral antibody mediated rejection*; cAMR) które obecnie traktowane jest jako podstawowa przyczyna późnej utraty przeszczepu. Wskaźnikiem inicjacji takiego procesu jest powstawanie *de novo* swoistych przeciwciał przeciwko niezgodnym antygenom zgodności tkankowej dawcy (ang. *Donor Specific Antibodies*; dnDSA) po transplantacji, czyli tworzenie ich przez pacjenta, u którego przed transplantacją nie wykrywa się ich obecności, co wiąże się z gorszym odległym przeżyciem przeszczepionej nerki. Pomimo, że po zabiegu przeszczepienia nerki zaleca się badanie na obecność dnDSA, to nie ma jednoznacznego konsensusu co do optymalnego czasu w jakim to badanie należy wykonać (w sytuacjach pogorszenia czynności graftu czy też wyprzedzająco/ profilaktycznie) i jak często je powtarzać. Jednym z powodów jest relatywnie wysoki koszt tych badań, istotny zwłaszcza przy ich regularnym wykonywaniu.

Za jeden z kilku z potwierdzonych i zidentyfikowalnych czynników ryzyka produkcji dnDSA uznawana jest nieadekwatna immunosupresja, jednak znaczenie poszczególnych leków immunosupresyjnych oraz zakres optymalnej ekspozycji na nie pod względem skutecznego zapobiegania produkcji DSA nie są w pełni jasne. Na dobór rodzaju immunosupresji, jej dawkowanie oraz stężenie leków, jakie należy utrzymywać, wpływa przedtransplantacyjna ocena tzw. ryzyka immunologicznego. Czynniki niskiego/umiarkowanego ryzyka to pierwszorazowe przeszczepienie, dobry dobór tkankowy (antygenów HLA dawcy i biorcy) oraz nieobecność preformowanych DSA. Przeciwnie – kolejna transplantacja, istotne uczulenie immunologiczne wynikające z obecności preformowanych DSA i słaby dobór HLA są czynnikami podwyższonego ryzyka immunologicznego, które może wiązać się z rozwojem ostrego odrzucania lub cAMR. Nie zawsze jednak niskie lub umiarkowane ryzyko immunologiczne wyklucza rozwój cAMR, a wtedy wskaźnikiem inicjacji takiego procesu jest wykrycie dnDSA. Leczenie immunosupresyjne opiera się na stosowaniu kilku leków, które mają

odmienne punkty uchwytu, tak by wzajemnie się uzupełniały, przy jednoczesnym ograniczeniu swoistej toksyczności. Pacjenci niskiego/umiarkowanego ryzyka immunologicznego otrzymują przewlekłe immunosupresję w tzw. schemacie trójlekowym, łączącym w większości przypadków takrolimus (TAC), mykofenolan mofetylu (MMF) oraz prednizon (PRED), bez stosowania biologicznego leku indukcyjnego. Dawki i stężenia leków są najwyższe w pierwszych 3 miesiącach po transplantacji i następnie są stopniowo zmniejszane, ale istnieją progi, poniżej których stężenia lub dawki konkretnego leku nie powinny się obniżyć. O ile tak się (nieplanowo) dzieje – narasta wtórne ryzyko immunologiczne. Ocena leczenia opiera się na terapeutycznym monitorowaniu stężeń leków, a w praktyce klinicznej ekspozycję na konkretny lek najczęściej obrazuje stężenie C_0 (czyli najniższe w ciągu doby, tuż przed podaniem kolejnej dawki). Rutynowo ocenia się stężenia takrolimusu (TAC), cyklosporyny (CsA), kwasu mykofenolowego (MPA) oraz syrolimusu (SIR). Jednym z postulowanych czynników ryzyka powstawania dnDSA jest istotna zmienność stężenia C_0 TAC stwierdzana w trakcie kolejnych wizyt ambulatoryjnych, co może sugerować nieprzestrzeganie zaleceń przez pacjenta (ang. *non-adherence*) lub występującą niezależnie - odmienną osobniczą metabolizację leków. W związku z tym że większość pacjentów otrzymuje trójlekowy schemat immunosupresji, ostateczny efekt ich siły jest wynikiem skumulowanego działania wszystkich leków. Ekspozycję na sumaryczne działanie kilkulekowej immunosupresji można oceniać stosując tzw. skalę Vasudeva (w modyfikacji dostosowanej do odrębności dziecięcych biorców przeszczepu nerki). Skala ta sumuje „siłę” działania kilku leków podawanych jednocześnie, nadając im rangę punktową w zależności od wysokości stosowanej dawki, przy czym w przypadku dzieci - z przeliczeniem na powierzchnię ciała.

Wyniki transplantacji nerki w Centrum Zdrowia Dziecka, wyrażające się w ostatniej dekadzie 98% 5-letnim przeżyciem pacjentów oraz 85% 5-letnim przeżyciem przeszczepu nerki wskazują, że stosowana w większości przypadków niskiego lub średniego ryzyka immunologicznego, standardowa trójlekowa immunosupresja podtrzymująca (takrolimus + mykofenolan mofetylu + prednizon) jest skuteczna w zachowaniu czynności nerki, a co za tym idzie powinna także zapobiegać powstawaniu DSA i rozwojowi przewlekłego humoralnego odrzucania. Jednocześnie z wcześniejszych naszych obserwacji wynika, że u chorych wykazujących tendencję do niekorzystnego przebiegu klinicznego i relatywnie szybkiego postępu niewydolności przeszczepionej nerki – wykonane po raz pierwszy (w takich

przypadkach) „późne” badanie w kierunku DSA wielokrotnie potwierdzało ich obecność, której towarzyszyły zmiany w biopsji nerki o typie cAMR.

Z tego powodu w obecnej pracy dokonano oceny retro- i prospektywnej częstości występowania DSA, w zależności od wskazań do tego badania, od czasu po transplantacji, a także oceny wpływu DSA na losy przeszczepu w perspektywie prospektywnej oraz oceny skuteczności podstawowej immunosupresji w zakresie zapobiegania powstawaniu dnDSA u dziecięcych biorców przeszczepu nerki niskiego i umiarkowanego ryzyka immunologicznego.

Celem podstawowym pracy była ocena skuteczności trójlekowego schematu immunosupresji stosowanej u chorych niskiego/miarkowanego ryzyka w zapobieganiu powstawania dnDSA w czasie dwuletniej obserwacji.

Cele dodatkowe:

1. ocena losów przeszczepu w badaniu retrospektywnym, u dziecięcych biorców przeszczepu nerki, u których badanie w kierunku DSA wykonywano tylko ze wskazań klinicznych;
2. zdefiniowanie rzeczywistej częstości obecności DSA w badaniu prospektywnym z 2-letnią obserwacją, u dziecięcych biorców przeszczepu nerki z grupy niskiego/umiarkowanego ryzyka immunologicznego, u których badanie w kierunku dnDSA wykonywano protokolarnie (w określonych punktach czasowych);
3. wykazanie istotności klinicznej powstawania dnDSA w grupie prospektywnej dla czynności przeszczepu;
4. ocena wpływu siły immunosupresji na ryzyko powstawania dnDSA:
 - zidentyfikowanie wartości C_0 TAC, przy której dnDSA nie występowały;
 - określenie wpływu wartości wskaźnika zmienności stężeń C_0 TAC na powstawanie dnDSA;
 - określenie czy wartość wskaźnika skumulowanej ekspozycji na trójlekową immunosupresję wg. skali Vasudeva (zmodyfikowanej dla dzieci) ma wpływ na wytwarzanie dnDSA.

Materiał i metody:

Badaniem objęto 67 chorych po przeszczepieniu nerki będących pod opieką Kliniki Nefrologii Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego Instytucie Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka. Chorzy należeli do dwóch odrębnych grup:

- I. grupy retrospektywnej (n= 29) po transplantacjach wykonanych w latach 2002 – 2013, u których wykonywano oznaczenie przeciwciał DSA tylko ze wskazań klinicznych (z powodu istotnego pogorszenia czynności graftu).
- II. grupy prospektywnej (n=38) po transplantacjach wykonanych w latach 2017-2018, u których oznaczenia DSA wykonywane było protokolarnie, w kolejnych punktach czasowych do 2 lat po przeszczepieniu, niezależnie od stanu klinicznego

Czasowe punkty badań to: 0 (w dniu transplantacji), oraz po 3, 6, 12 i 24 miesiącach od przeszczepienia. U tych chorych oceniano stężenia C₀ takrolimusu w odstępach czasowych: 1, 3, 6, 12, 18 i 24 miesiące po transplantacji oraz wskaźnik zmienności stężenia C₀ takrolimusu w czasie 1 i 2 lat po transplantacji, wyliczany na podstawie wszystkich kolejnych wyników badań stężenia. Parametrem oceny czynności przeszczepionej nerki było stężenie kreatyniny i szacowany wskaźnik przesączania kłębuszkowego (eGFR) wg. zmodyfikowanej formuły Schwartz'a. Biopsje nerki wykonywano u pacjentów należących do obu grup wyłącznie ze wskazań klinicznych). Ich wyniki oceniano w patomorfologicznej skali Banff. Ocenę obecności i (pośrednio) miano przeciwciał (wyrażone jako MFI – *Mean Fluorescence Intensity*) wykonano techniką multiplexów przy użyciu analizatora Luminex.

Podsumowanie wyników:

1. w prospektywnej dwuletniej ocenie pacjentów niskiego/średniego ryzyka immunologicznego wykazano systematyczny wzrost częstości występowania dnDSA z wartości 8% po 3 miesiącach, poprzez 11% po 6, 16% po 12 i 21% po 24 miesiącach obserwacji; w 75% przypadków były to przeciwciała klasy II, a w pozostałych 25% - klasy I;
2. we wszystkich potwierdzonych przypadkach obecności przeciwciał w grupie prospektywnej wartość MFI dnDSA była niższa od 3000, a wartość kalkulatora ryzyka DSA-RIS (ang. *DSA-Representative Scoring System*) oceniającego u dzieci po

- transplantacji nerki ryzyko rozwoju odrzucania humoralnego była niska i wynosiła 2 (przy progu odcięcia 17, dla prawdopodobieństwa > 95%);
3. u 18% pacjentów z grupy prospektywnej wystąpiły wskazania do biopsji nerki, z czego w 70% rozpoznano ostre odrzucanie, niemniej w żadnej biopsji nie potwierdzono zmian o typie odrzucania humoralnego;
 4. przeżycie czynności przeszczepu nerki w grupie prospektywnej wynosiło po roku obserwacji 100%, po 2 latach - 97%;
 5. obecność dnDSA udowodniona prospektywnie, wykazywała związek z istotnym (4.5 - krotnie wyższym) ryzykiem pogorszenia czynności przeszczepu nerki, wyrażonej jako obniżenie eGFR o ponad 30% od wartości wyjściowej, niezależnie od nieobecności humoralnego odrzucania;
 6. analizując dwie podgrupy chorych obserwowanych prospektywnie, pacjentów którzy wytworzyli przeciwciała (dnDSA (+)) oraz chorych nie wytwarzających przeciwciał (dnDSA (-)) wykazano, że: - nie różnili się pod względem zakresu i dawek stosowanych leków immunosupresyjnych; - pacjenci dnDSA (-) mieli istotnie wyższą wartość mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) (dane wyliczone z kolejnych 181 oznaczeń) o wysokości 7.9 vs 7.1 ng/ml (p=0.088); - nie wykazano istotnej różnicy w zakresie wartości współczynnika zmienności TAC C₀ między pacjentami dnDSA (-) i dnDSA (+) (31 vs. 29; p = 0,56); nie wykazano istotnej różnicy w zakresie wartości wskaźnika Vasudeva (skumulowanej siły immunosupresji), obliczanego po 12 i 24 miesiącach po transplantacji (odpowiednio 6.3 vs 6.1 i 5.3 vs 4.1, NS);
 7. analiza grupy retrospektywnej wykazała, że: - w grupie tej (przy 100% obecności dnDSA, w tym w 28% klasy I, w 52% klasy II, a w 21% obydwu klas) w 66 % wykonanych biopsji wykazano cechy przewlekłego humoralnego odrzucania, a 41% chorych utraciło przeszczep w ciągu 2.4 roku po wykryciu dnDSA;
 8. w grupie retrospektywnej wartość mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) w oznaczeniach w czasie dwóch lat poprzedzających wytworzenie dnDSA (liczba oznaczeń 145), w porównaniu do mediany wartości z oznaczeń pomiędzy 3. a 24. miesiącem po transplantacji w grupie prospektywnej (liczba oznaczeń 181) była istotnie niższa i wynosiła 5,6 vs 7.3 ng/ml (p<0.0001); - wartość współczynnika zmienności stężenia takrolimusu, w okresie dwuletniej obserwacji przed wykryciem

dnDSA, była wyższa w porównaniu do wartości występującej w grupie prospektywnej (30 vs 23%), ale tylko na granicy istotności statystycznej ($p=0.056$);

9. analiza porównująca chorych dnDSA (+) i dnDSA (-) bez względu na przynależność do grupy (prospektywnej lub retrospektywnej) wykazała, że wartość mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) u pacjentów dnDSA (-) (liczba próbek 145) była istotnie wyższa, niż u chorych dnDSA (+) (liczba próbek 181); odpowiednio 7.4 vs 6.0 ($p < 0.0001$).

Wnioski:

Podstawowy

Trójlewkowa immunosupresja, składająca się z takrolimusu, mykofenolanu mofetylu i prednizonu, stosowana po transplantacji nerki u pediatrycznych pacjentów niskiego/umiarkowanego ryzyka immunologicznego, w większości przypadków zapobiega powstawaniu swoistych przeciwciał przeciwko niezgodnym antygenom dawcy (dnDSA), przy czym ten efekt jest przede wszystkim skutkiem stosowania takrolimusu i utrzymywania jego stężenia w górnych wartościach zalecanego zakresu.

Dodatkowe

1. Obecność przeciwciał dnDSA wykrywana w badaniu wykonywanym ze wskazań klinicznych (w grupie retrospektywnej) była związana z obecnością odrzucania przeszczepu (potwierdzonego biopsją) w 2/3 przypadków (w tym w 66% o charakterze przewlekłego humoralnego odrzucania) oraz utratą przeszczepu nerki w 41% przypadków w ciągu 2.4 roku od ich wykrycia
2. W prospektywnej dwuletniej ocenie pacjentów niskiego/średniego ryzyka immunologicznego wykazano systematyczny wzrost częstości występowania dnDSA z wartości 8% po 3 miesiącach, poprzez 11% po 6, 16% po 12 i 21% po 24 miesiącach obserwacji; w 75% przypadków były to przeciwciała klasy II, a w pozostałych 25% klasy I
3. Obecność przeciwciał dnDSA wykazywana prospektywnie, miała związek z istotnym (4.5-krotnie wyższym) ryzykiem pogorszenia czynności przeszczepu nerki w ciągu dwuletniej obserwacji, wyrażonej jako szacowana wielkość przesączania kłębuszkowego o ponad 30% od wartości wyjściowej, niezależnie od nieobecności humoralnego odrzucania

4. W zakresie oceny siły immunosupresji:

- wykazano, że przeciwciała dnDSA nie występowały u chorych, u których mediana stężenia takrolimusu (TAC C₀) wyliczona z oznaczeń wykonanych w okresie dwuletniej obserwacji lub (odpowiednio) dwóch lat poprzedzających pojawienie się dnDSA, była ≥ 7.4 ng/ml;
- nie wykazano istotnej różnicy w zakresie wartości współczynnika zmienności stężenia takrolimusu (TAC C₀) między pacjentami produkującymi i nie produkującymi przeciwciała dnDSA;
- nie wykazano związku występowania/niewystępowania przeciwciał dnDSA z wartością wskaźnika skumulowanej siły trójlekowej immunosupresji (wg.Vasudeva), co wskazuje, że podstawowym lekiem wpływającym na zahamowanie powstawania dnDSA jest takrolimus, pod warunkiem utrzymywania jego stężenia na odpowiedniej wysokości.