

Lek. Agnieszka Urzykowska

**Ocena skuteczności trójlekowego schematu immunosupresji w zapobieganiu wytwarzania
swoistych przeciwciał anty-HLA**

**(ang. *donor-specific antibodies*; DSA) u dzieci po transplantacji nerki- badanie
retrospektywne i prospektywne**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. n med. Ryszard Grenda

Wyniki pracy zostały częściowo opublikowane w postaci artykułu oryginalnego

Children (Basel) 2021;8(12):1162. doi: 10.3390/children8121162

Praca wykonana

w Klinice Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego

z wykorzystaniem grantu IPCZD nr S150

Warszawa 2023

SPIS TREŚCI

I.	Wykaz skrótów	4
II.	Streszczenie pracy w języku polskim i angielskim	6
III.	Wstęp	
	1. Wskazania od transplantacji nerki u dzieci.	
	2. Czynniki ryzyka immunologicznego u pacjentów kwalifikowanych do transplantacji...	
	3. Dawki i zakres stężeń leków immunosupresyjnych.....	
	4. Rodzaje przeciwciał DSA i czynniki ryzyka ich wytworzenia.....	
	5. Wpływ leczenia immunosupresyjnego na wytwarzanie przeciwciał DSA.....	
IV.	Hipoteza badawcza i cel badania	
V.	Pacjenci	
VI.	Metody	
	1. Charakter badania	
	2. Kryteria włączenia do i wyłączenia z badania	
	3. Czasowe punkty badań dla grupy prospektywnej.....	
	4. Punkty oceny w grupie retrospektywnej	
	5. Zakres analizowanych danych.....	
	6. Metodyka laboratoryjna.....	
	7. Metody analizy statystycznej.....	
VII.	Wyniki	
	1. Dane opisowe grupy prospektywnej i retrospektywnej.....	
	2. Analiza porównawcza w obrębie grupy prospektywnej z uwzględnieniem podziału na pacjentów z obecnymi i nieobecnymi dnDSA.....	
	3. Analiza porównawcza wybranych wskaźników pomiędzy pacjentami z grupy prospektywnej a retrospektywnej.....	
	4. Analiza porównawcza stężeń TAC C ₀ pomiędzy pacjentami dnDSA(-) i dnDSA(+) niezależnie od przynależności do grupy.....	
	5. Podsumowanie wyników.....	
VIII.	Dyskusja	
IX.	Ograniczenia i kliniczne korzyści wynikające z badania	

X.	Wnioski
XI.	Piśmiennctwo
XII.	Tabele z danymi źródłowymi
XIII.	Addendum

Wykaz skrótów

AMR- odrzucanie zależne od przeciwciał (ang. *antibody mediated rejection*)

cAMR- przewlekłe odrzucanie zależne od przeciwciał (ang. *chronic antibody mediated rejection*)

anty-HLA- przeciwciała przeciwko ludzkim antygenom leukocytarnym

AT₁R-Ab- przeciwciała przeciwko receptorowi typu 1 dla angiotensyny II

AUC- pole pod krzywą stężenia leku (ang. *area under a curve*)

AZA- azatiopryna

C_{4d}- składnik dopełniacza C_{4d}

C_{1q}-składnik dopełniacza C_{1q}

C_{5b-9} -kompleks atakujący błonę (ang. *membrane attack complex*)

CAKUT- wady wrodzone budowy nerek i układu moczowego (ang. *congenital anomalies of kidney and urinary tract*)

CAN- przewlekła nefropatia przeszczepu (ang. *chronic allograft nephropathy*)

CMV- wirus cytomegalii

CNI- inhibitor kalcyneuryny (ang. *calcineurin inhibitor*)

C₀ - minimalne stężenie leku przed kolejną dawką

C₀ TAC - minimalne stężenie tacrolimusu przed kolejną dawką

CsA- cyklosporyna

CV – współczynnik zmienności (ang. *coefficient of variation*)

CYP3A5- genotyp cytochromu p450

dd-cfDNA- pozakomórkowe swoiste DNA dawcy (ang. *donor specific cell-free DNA*)

dnDSA- swoiste przeciwciała przeciw antygenom dawcy powstałe „de novo” (ang. *de novo donor specific antibodies*)

DSA –przeciwciała przeciwko antygenom dawcy

EBV- wirus Epsteina-Barr (ang. *Epstein-Barr virus*)

eGFR- szacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej (ang. *estimated glomerular filtration*)

ET_A R-Ab- - przeciwciała przeciwko receptorowi typu A dla endoteliny-1

EVR- ewerolimus

FSGS- ogniskowe stwardnienia kłębuszków (ang. *focal segmental glomerular sclerosis*)

HLA- ludzkie antygeny leukocytarne (ang. *Human Leukocyte Antigens*)

IF/TA - włóknienia zrębu i zanik cewek nerkowych (ang. *interstitial fibrosis/tubula atrophy*)

IL- 18- interleukina 18

MFI- średnia intensywność fluorescencji (ang. *mean fluorescence intensity*)

MMF- mykofenolan mofetylu

MPA –kwas mykofenolowy (ang. *mycophenolic acid*)

mTOR- inhibitor kinazy mTOR (ang. *mTOR inhibitor*)

NAPRTCS- amerykański rejestr dotyczący przeszczepienia nerek u dzieci (ang. *North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies*)

PRA – panel reaktywnych przeciwciał (ang. *panel reactive antibodies*)

Pred- prednizon

TAC- tacrolimus

TGF-β- transformującego czynnika wzrostu-beta

RIS-DISA- kalkulator prawdopodobieństwa wystąpienia odrzucania humoralnego (ang. *DSA- Representative Scoring System*)

SIR – sirolimus

SD- odchylenie standardowe

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 metabolizm 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 + prednison) 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 dnDNA (-) (liczba próbek 145) była istotnie wyższa, niż u chorych dnDSA (+) (liczba próbek 181); odpowiednio 7.4 vs 6.0 ($p < 0.0001$).

Wnioski:

Podstawowy

Trójlekowa 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 (potwierzonego 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.

Abstract

Evaluation of cumulative effect of standard triple immunosuppression on prevention of *de novo* donor specific antibodies (dnDSA) production in children after kidney transplantation – a retrospective and prospective study.

Long-term outcome of kidney transplantation is affected by several superimposed factors, however chronic humoral antibody mediated rejection (cAMR) is a major factor related to the late graft loss. De novo occurrence of donor specific antibodies (dnDSA) is a predictive phenomenon of a further dysfunction of the graft. Evaluating of dnDSA is currently recommended, however the optimal timing and a frequency of this evaluation is still discussed, as well as cost-effectiveness of such monitoring on regular basis. One of known factors promoting the development of dnDSA is a suboptimal immunosuppression, however a specific impact of the certain maintenance drugs on this risk is not fully clarified. Apparently, the selection of immunosuppressive protocol, dosage and a target drug blood concentration should be adjusted to pre-transplant stratification of the immunological risk in individual patient. Primary transplantation, optimal HLA matching and absence of preformed DSA are regarded as the factors of a low risk and in contrary, a retransplantation, poor HLA matching and sensitization related to the presence of preformed DSA are regarded as the factors of a high risk, which may be a underlying cause of acute or further chronic antibody mediated rejection (cAMR). Despite these associations, the patients at low immunological risk may also develop dnDSA. The protocols of immunosuppression are usually combined of three different drugs, having various mechanisms of action, given together they achieve a synergistic effect and also to minimize the specific adverse events, once the dosing may be decreased, while drugs are combined. Patients of low-to-moderate immunological risk receive mainly a triple immunosuppression protocol, including tacrolimus (TAC), mycophenolate mofetil (MMF) and prednisone (Pred), with no biologic induction. The initially high doses and drug concentrations are then systematically reduced after kidney transplantation, however there are certain thresholds, below which the further reduction may increase the risk of rejection. Therapeutic drug monitoring is based mainly on evaluation of a minimal, pre-dose concentration (C_0), which is a routine for therapy with calcineurine and mTOR inhibitors, and is also used in evaluation of mycophenolic acid (MPA). Suboptimal blood concentration, as well as high

inpatient variability of a drug concentration (mainly tacrolimus), which might be regarded as a marker of non-adherence (or defect of drug metabolism), may be a trigger of dnDSA development. However, as most patients receive a triple-drug immunosuppression, a final immunosuppressive power is related to the effect of all three drugs, which rises a question about the relevance of cumulated therapy in terms of dnDSA production. Vasudev et al. have invented a specific score, which allows to sum a power of different immunosuppressive drugs, as one calculated number. The original scale was modified for pediatric transplant patients, after adjustment of the doses to body surface area.

The outcomes of kidney transplantation in Children's Memorial Health Institute, with 98% 5-year patient survival and 85% 5-year graft survival suggest, that commonly used triple protocol (TAC+MMF+Pred) in low-to-moderate risk patients is effective in most cases, however there were several patients, who reduced the kidney function over time, presented cAMR in a biopsy and (once the DSA testing became available), presented DSA, late after transplantation. With this experience, the present study combined two separate groups of patients: - a retrospective, and – a prospective one, in terms of analysis of incidence of dnDSA over time, impact of dnDSA on kidney graft outcome and evaluation of a basic maintenance triple immunosuppression on a dnDSA appearance in children after kidney transplantation, regarded as remaining at low-to-moderate immunological risk.

The primary aim of the study was the evaluation of triple immunosuppression (TAC+MMF+Pred) efficacy in terms of preventing the development of dnDSA in two-year prospective follow-up.

Secondary purposes were as following:

1. Evaluation of kidney graft outcome in a retrospective group of patients, in whom the presence of dnDSA was confirmed by testing for the clinical indications only
2. Defining of the dnDSA incidence in a prospective group followed for two years after transplantation, in whom dnDSA testing was performed regularly, by protocol
3. Evaluation of clinical relevance of dnDSA for maintaining a kidney function (in a prospective group)
4. Evaluation of the effect of immunosuppression protocol on development of dnDSA:
- defining the threshold of C_0 TAC by which dnDSA did not develop

- evaluation of C₀ TAC inpatient variability effect on the development of dnDSA
- evaluation of the effect of the cumulative exposure to triple immunosuppression (Vasudev score) on development of dnDSA

Patient and methods.

Overall 67 patients have been evaluated and were divided in two groups:

- I. retrospective group (n= 29) of patients transplanted between 2002 – 2013, in whom the testing for dnDSA was done only for clinical indications in variable timing
- II. prospective group (n=38) of patients transplanted between 2017-2018, in whom regular dnDSA testing was done by protocol, up to 2 years post-transplant, nevertheless the clinical status

Timing of dnDSA testing was: day 0 (at transplantation), then after 3, 6, 12 i 24 after transplantation. All patients have been tested for TAC C₀ whole blood concentration at 1, 3, 6, 12, 18 i 24 months after transplantation. Inpatient variability of TAC C₀ (coefficient of variation) was evaluated at 1 and 2 years after transplantation, based on all available consecutive results of TAC C₀, eGFR modified Schwartz formula was used to evaluate kidney function. Kidney biopsies were evaluated with use of the Banff criteria. Presence of dnDSA and (non-direct) concentration - MFI (Mean Fluorescence Intensity) was evaluated with a multiplex technique and the Luminex analyser.

Summary of results

Prospective group

1. regular increase of dnDSA incidence from 8% at 3 months, trough 11% at 6, 16% at 12 and 21% at 24 months was documented in a prospective group; 75% of these dnDSA was of class II and 25% of class I
2. in all dnDSA detected cases in a prospective group, the value of MFI dnDSA was < 3000, and DSA-Representative Scoring System value, relevant for prediction of humoral rejection was 2 (while predictive threshold is 17)
3. kidney biopsy was performed (due to the clinical indications) in 18% of patients from prospective group and in 70% acute cellular rejection was diagnosed (while no case of cAMR)

4. 1 -year graft survival was 100% and 2-year graft survival was 97% in a prospective group
5. the presence of dnDSA, revealed in a prospective group was associated with significant, 4.5-time higher risk of deterioration of graft function (expressed as decrease of eGFR > 30% below baseline), despite an absence of cAMR
6. dnDSA negative and dnDSA positive patients from a prospective group: - were not different in terms of immunosuppressive protocol and drug dosing; - dnDSA (-) patients showed significantly higher median value of TAC C₀ (based on data from 181 evaluations) 7.9 vs 7.1 ng/ml (p=0.088), than dnDSA (+) patients; - showed no significant difference in terms of inpatient variability of TAC C₀ (coefficient of variation)(31 vs. 29; p = 0,56).; showed no difference in terms of the Vasudev score, calculated at 12 and 24 months after transplantation (6.3 vs 6.1 and 5.3 vs 4.1; respectively; NS)

Retrospective group

1. analysis of a retrospective group (100% of dnDSA presence; 28% of class I, 52% of class II and 21% class I and II) showed, that cAMR was diagnosed in 66% of kidney biopsies, and 41% of patients lost the graft within (median) 2.4 years after the detecting of dnDSA
2. the median value of TAC C₀ in all available evaluation within two years preceding the detection of dnDSA (n= 145) in a retrospective group, compared with this value calculated between 3rd and 24th month after transplantation in a prospective group(n= 181) was significantly lower (5,6 vs 7.3 ng/ml (p<0.0001)
3. inpatient variability of TAC C₀ (coefficient of variation) calculated within two-year prior to the detection of dnDSA, was (by number) higher than in prospective group (30 vs 23%), however the difference was not significant (p=0.056)

DSA(+) vs DSA (-) patients nevertheless the group:

- analysis showed, that the median value of TAC C₀ (n= 326) in dnDSA (-) patients was significantly higher than in dnDSA (+) patients (7.4 vs 6.0 respectively; p< 0.0001), than in dnDSA (-) patients.

Conclusions:

Primary conclusion:

Triple immunosuppression, including tacrolimus, mycophenolate mofetil and prednisone, prevent the production of de novo donor specific antibodies (dnDSA) in most of the pediatric kidney transplant recipients of low-to-moderate immunological risk, however this efficacy is related mainly to the effect of tacrolimus and maintaining of its blood concentration on high level within recommended target range.

Secondary conclusions

1. The presence of dnDSA detected in the tests performed due to the clinical indications (in prospective group) was associated with biopsy-proven rejection in 2/3 of cases and cAMR pattern in 66% of them, resulting in graft loss in 41% of cases within next 2.4 years of follow-up
2. A regular increase of dnDSA incidence from 8% at 3 months, through 11% at 6; 16% at 12 and 21% at 24 months, was documented in a prospective group
3. The presence of dnDSA, revealed in a prospective group, was associated with a significant, 4.5-time higher risk of deterioration of graft function (expressed as decrease of eGFR > 30% below baseline), despite an absence of cAMR
4. The relevance of the immunosuppression for the development of dnDSA:
 - patients with median value of TAC C₀ ≥ 7.4 (calculated of all results within 2 years after transplantation or within 2 -years before detecting dnDSA) did not develop dnDSA
 - there was no significant difference between the values of inpatient variability of TAC C₀ (coefficient of variation) in DSA(+) and DSA(-)
 - there was no difference in terms of cumulative power of triple immunosuppression (the Vasudev score) between DSA(+) and DSA (-), therefore the preventive effect on dnDSA production is mainly related to the high concentration of tacrolimus

Wstęp

Wskazania do transplantacji nerki u dzieci.

Transplantacja nerki jest u dzieci docelową i optymalną w większości przypadków metodą leczenia nerkozastępczego. Od czasu przeprowadzenia pierwszego skutecznego zabiegu przeszczepienia nerki nastąpiła znaczna poprawa rokowania, co do przeżycia czynności przeszczepu, związana z udoskonaleniem protokołów immunosupresji i jej monitorowania, profilaktyki i leczenia chorób zakaźnych oraz rozrostowych, typowych dla chorych z obniżoną odpornością. Postęp w zakresie techniki chirurgicznej i opieki okołoperacyjnej umożliwiły udane przeszczepienia nerki u coraz mniejszych i młodszych dzieci. Najczęstszym wskazaniem do kwalifikacji pacjentów pediatrycznych do przeszczepienia nerki jest przewlekła choroba nerek w stadium 5 ($eGFR < 15 \text{ mL/min/1.73m}^2$) rozwijająca się na podłożu wad wrodzonych budowy nerek i układu moczowego (ang. *congenital anomalies of kidney and urinary tract*; CAKUT), takich jak aplazja/hipoplazja/dysplazja nerek oraz uropatia zaporowa (łącznie ok. 50% według rejestrów europejskich), a następnie różne glomerulopatie i inne schorzenia [1]. Najczęściej wiek pacjentów w momencie przeszczepienia to 13 -17 lat (38,8%), pomiędzy 6 a 12 lat (32,3%), od 2 do 5 lat (15,3%), a najrzadziej transplantacje wykonuje się u dzieci poniżej 1 roku życia (5,5%). Wg danych amerykańskiego rejestru NAPRTCS, na przestrzeni ubiegłych lat (2012-2017) wskaźniki zarówno rocznego jak i pięcioletniego przeżycia czynności przeszczepu nerki istotnie wzrastały, i obecnie 1 – roczne przeżycie wynosi 99% w przypadkach transplantacji narządu od dawców żywych, oraz 97% od dawców zmarłych, natomiast 5-letnie przeżycie przekracza 90% niezależnie od pochodzenia narządu[2]. Na wyniki transplantacji wpływa wiele czynników, w tym jakość narządu (żywy lub zmarły dawca); wiek i wielkość masy ciała dawcy, liczba niezgodnych antygenów HLA i odpowiednio obecność przeciwciał anti-HLA, długość czasu zimnego niedokrwienia, występowanie (lub nie) opóźnionej funkcji przeszczepu, jak również późniejsze uszkodzenie przeszczepu spowodowane nawrotem choroby podstawowej (np. zespołu nerczykowego na podłożu ogniskowego stwardnienia kłębuszków; FSGS), zakażeniami, oraz epizody ostrego lub przewlekłego odrzucania [3].

Najczęstsze przyczyny zgonu pacjentów to infekcje (27,9%), powikłania sercowo-płucne (14,5%), nowotwory (11,3%) oraz powikłania związane z wcześniejszym leczeniem nerkozastępczym (3%). Niespełna połowa dorosłych pacjentów umiera z przyczyn ogólnych (wieku) lub w przebieg powikłań - z nadal czynnym przeszczepem [4,5,6,7].

Należy pamiętać, że ponad połowa dzieci kwalifikowanych do przewlekłej dializoterapii, a następnie do transplantacji nerki ma dodatkowe, wrodzone, przewlekłe schorzenia

towarzyszące (ang. *comorbidities*), których obecność pogarsza rokowanie, niezależnie od utrzymania dobrej czynności przeszczepu nerki [8].

Czynniki ryzyka immunologicznego.

Podstawowa immunosupresja jest dobierana do oszacowanego przed transplantacją zakresu ryzyka immunologicznego. Czynniki niskiego ryzyka obejmują pierwszorazową transplantację, dobry dobór tkankowy, dobrą biologiczną jakość przeszczepu i relatywnie krótki czas zimnego niedokrwienia (<12-15 godzin). Odwrotność tych cech, czyli retransplantacja, słaby dobór tkankowy, obecność preformowanych przeciwciał anty-HLA swoistych dla dawcy (ang. *donor-specific antibodies*; DSA), przeszczepienie narządu pobranego od dawcy o rozszerzonych kryteriach kwalifikacji i długi czas zimnego niedokrwienia (>12-15 godzin) to czynniki wysokiego ryzyka [9,10]. Zasady oceny (stratyfikacji) ryzyka przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Stratyfikacja czynników ryzyka immunologicznego przed transplantacją nerki

Czynniki niskiego ryzyka	Czynniki podwyższonego ryzyka	Czynniki najwyższego ryzyka
Dobry dobór tkankowy	Słaby dobór tkankowy	„Historyczny” dodatni cross-match
Dobra jakość narządu	Ostra martwica cewek	PRA >50%
Krótki czas niedokrwienia	Nieprzestrzeganie zaleceń (<i>non-adherence</i>)	Obecność preformowanych DSA
Dobry stan ogólny biorcy, brak uszkodzeń innych narządów	Nietypowy metabolizm leków	Utrata poprzedniego przeszczepu wskutek odrzucania

Można także klasyfikować ryzyko jako średnie, o ile występuje tylko jeden z czynników wysokiego ryzyka (np. słaby dobór tkankowy), ale pozostałe czynniki są sprzyjające (np. dobra jakość narządu, krótki czas zimnego niedokrwienia). U chorych niskiego/średniego ryzyka stosuje się obecnie trójlekową immunosupresję (takrolimus + mykofenolan mofetylu + prednizon), poza przypadkami kwalifikowanymi do wczesnego wycofania steroidów, gdzie dodawana jest indukcja blokująca, celem wzmocnienia immunosupresji w czasie usunięcia

prednizonu. U chorych wysokiego ryzyka immunologicznego dodatkowo stosuje się indukcję blokującą (bazyliksymab) lub deplecyjną (tymoglobulina), nie wycofując steroidów [3,10].

Dawki i zakres stężeń leków immunosupresyjnych.

Dawki i stężenia leków stosowanych w praktyce klinicznej Centrum Zdrowia Dziecka podano w tabeli 2.

Tabela 2. Rutynowe dawki leków immunosupresyjnych oraz ich stężenie terapeutyczne u dzieci po transplantacji nerki [3, 10].

Lek	Dawkowanie	Stężenie we krwi (C ₀)
CyklosporynaA(CsA)	Doustnie: początkowo 300 mg/m ² w dwóch-trzech dawkach/dobę; następne dawki pod kontrolą stężenia; średnio 4-5 mg/kg/dobę	Poziom przed kolejną dawką: <ul style="list-style-type: none"> • w pierwszym miesiącu po Tx: 200-250 ng/ml • 2-6 miesiąc po Tx: 175-250 ng/ml • 6-12 miesiąc po Tx: 175-200 ng/ml • > 1 roku po Tx: 150-175 ng/ml *
Takrolimus(TAC) Advagraf (takrolimus o	Doustnie: początkowo 0,2mg/kg w dwóch dawkach/dobę, następne dawki pod kontrolą stężenia 0,4 mg/kg w jednej dawce dobowej następne dawki pod kontrolą stężenia	Stężenie przed kolejną dawką: <ul style="list-style-type: none"> • w pierwszym miesiącu po Tx: 10-15 ng/ml • 1-6 miesiąc po Tx:

przedłużonym działaniu)		5-10-12 ng/ml ** • > 6 mies. po Tx: 5-10 ng/ml *
Mykofenolan mofetylu (MMF)	Doustnie: do 1,2 g/m ² w dwóch dawkach, w podstawowej immunosupresji ***	Nie stosuje się rutynowo oznaczeń stężenia kwasu mykofenolowego(MPA) przed kolejną dawką (C ₀) W wybranych przypadkach oznaczenia zakres: 1-3 µg/ml
Prednizon (Pred)	Doustnie: początkowo 60 mg/m ² w czterech dawkach; potem co tydzień: 30-15-9-6 mg/m ² w dwóch, potem jednej dawce; docelowo dawka < 0,1 mg/kg ****	Nie stosuje się rutynowo oznaczeń stężenia leku
Sirolimus (SIR)	Doustnie: dawka nasycająca 6mg/m ² /dobę (≤6mg/dawkę), podtrzymująca 2mg/m ² /dobę; następnie dobierana do stężenia leku we krwi	Zakres: 4-12 ng/ml
Everolimus (EVR)	Doustnie: dawka nasycająca 2 mg/m ² /dobę, następnie dobierana do stężenia leku we krwi	Zakres: 3-6 ng/ml *****
Bazyliksymab	Dożylnie w dobie 0 i dobie 4: <ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/dawkę < 40 kg masy ciała • 20 mg/dawkę > 40 kg masy ciała • łącznie 2 dawki 	Nie ocenia się rutynowo stężenia leku ani wysycenia receptorów

Tymoglobulina	Dożylnie od doby 0 (w indukcji) przez 7 dni W leczeniu ostrego odrzucania (do 7 dni) Dawka wstępna 1.25-1.5 mg/kg	Przed kolejną dawką: liczba komórek T CD ₃ (dobranie lub opuszczenie kolejnej dawki zależy od liczby komórek; docelowo 25-50/mm ³)
Rytuksymab	Dożylnie 375 mg/m ² co 7 dni; Łącznie 1-4 dawek, zależnie od wskazania	Przed kolejną dawką liczba komórek B CD ₁₉ (przy deplecji do 0 dawkę należy opuścić)

* przy przewlekłej nefrotoksyczności inhibitora kalcyneuryny docelowe stężenie leku może być niższe (w skojarzeniu z innymi lekami)

** wysokość pożądanego stężenia zależy m.in. od indywidualnej tolerancji leku

*** przy kojarzeniu MMF i TAC, dawka MMF powinna być obniżona; wielkość dawki powinna być ustalona na podstawie oznaczenia stężenia kwasu mykofenolowego (MPA) we krwi.

**** nie dotyczy schematu eliminującego steroidy

***** przy terapii skojarzonej z inhibitorem kalcyneuryny (ang. *calcineurine inhibitor*; CNI) Niezależnie od ryzyka immunologicznego u dzieci dodatkową trudnością w podtrzymywaniu immunosupresji są odrębności w zakresie metabolizmu, tolerancji i występowania działań niepożądanych immunosupresji. Dotyczą one [3]:

- wysokiej aktywności cytochromu P450-3P < 5. roku życia, co powoduje zniżenie stężenia minimalnego (C₀) CNI; utrzymanie optymalnego pola pod krzywą (ang. *area under a curve* – AUC) stężenia leków wymaga w tej sytuacji stosowania trzech dawek na dobę, co pogarsza stopień przestrzegania zaleceń (ang. *adherence*), ponieważ podanie trzeciej dawki wypada nocą (ok. godziny 1.00); rozwiązaniem problemu (choć nie we wszystkich przypadkach) może być stosowanie takrolimusu o przedłużonym działaniu (Advagraf),
- często występującej zmienności stężenia (C₀) inhibitorów kalcyneuryny, wynikającej ze zmiennych procesów wchłaniania leków przy różnej diecie i skłonności dzieci do rozwijania zaburzeń jelitowych,

- częstego występowania biegunki polekowej na początku stosowania mykofenolanu mofetylu, przede wszystkim w przypadku skojarzenia tego leku z takrolimusem,
- podatność na neurotoksyczne działania CNI, szczególnie u dzieci z wywiadem padaczkowym; wymaga to stosowania profilaktycznie leków przeciwdrgawkowych i kontrolowania ich stężenia we krwi, zwłaszcza z uwagi na ich interakcje w cytochromie P450 z CNI,
- podatności na promujące limfoproliferację działania poliklonalnych przeciwciał wobec niskiej częstości seropozytywnego statusu wirusa Epsteina-Barr (ang. *Epstein--Barr virus* – EBV) < 10. roku życia, przy jednoczesnej wysokiej częstości występowania seropozytywności u dawców (starszych od biorcy)
- wysokiego ryzyka nieprzestrzegania zaleceń (ang. *non-adherence*) wśród nastolatków,
- niedoboru wzrostu wskutek kortykoterapii, co skłania do wycofania tych leków (wczesnego lub późnego odstawienia steroidów) w odpowiednio dobranym protokole.

O odległych losach przeszczepu nerki decyduje wiele opisanych wyżej nakładających swoje znaczenie czynników, niemniej jednym z podstawowych jest przewlekłe odrzucanie humoralne (ang. *chronic antibody mediated rejection*; cAMR). Jednym z podstawowych elementów służących rozpoznaniu cAMR jest obecność swoistych przeciwciał przeciwko antygenom zgodności tkankowej dawcy (*Human Leucocyte Antigen*; HLA) (ang. *Donor Specific Antibodies*; DSA) mająca także wartość predykcyjną, pozwalającą na przewidywanie zagrożenia co do długotrwałego utrzymania dobrej czynności przeszczepu nerki. Proces cAMR można podzielić na dwa główne typy- fenotyp 1 rozwijający się u pacjentów z obecnymi przeciwciałami preformowanymi (czyli u pacjentów wysokouczulonych), którego objawy rozpoczynają się we wczesnym okresie potransplantacyjnym oraz fenotyp 2 wywołany tworzącymi się z czasem *de novo* DSA (dnDSA) (zwykle klasa II ± klasa I) i często bez obecności złogów C4d *in-situ* w biopsji nerki, który rozwija się w późnym okresie potransplantacyjnym, głównie w związku z nieprzestrzeganiem zaleceń co do regularnego stosowania immunosupresji. Fenotyp 2 stanowi istotną przyczynę późnej utraty przeszczepu [11,12].

W rozpoznawaniu histopatologicznym cAMR posługujemy się klasyfikacją Banff, która ocenia zmiany morfologiczne w przeszczepionej nerce [13,14,15,16].

Do rozpoznania przewlekłego aktywnego odrzucania przeszczepu, diagnozowanego przy systematycznie pogarszającej się czynności przeszczepionej nerki, wymagane jest spełnienie 2 z 3 kryteriów:

1. serologicznego (obecności złogów DSA w krążeniu biorcy),
2. immunomorfologicznego (obecności złogów C_{4d} w kapilarach okołocewkowych)
3. morfologicznego z obecnością takich zmian, jak:
 - zdwojenie okonturowania kapilar kłębuszkowych i/lub
 - zwielokrotnienie okonturowana błon podstawnych kapilar okołocewkowych i/lub
 - włókniste pogrubienie błony wewnętrznej tętnic i/lub
włóknienie zrębu i zanik cewek nerkowych

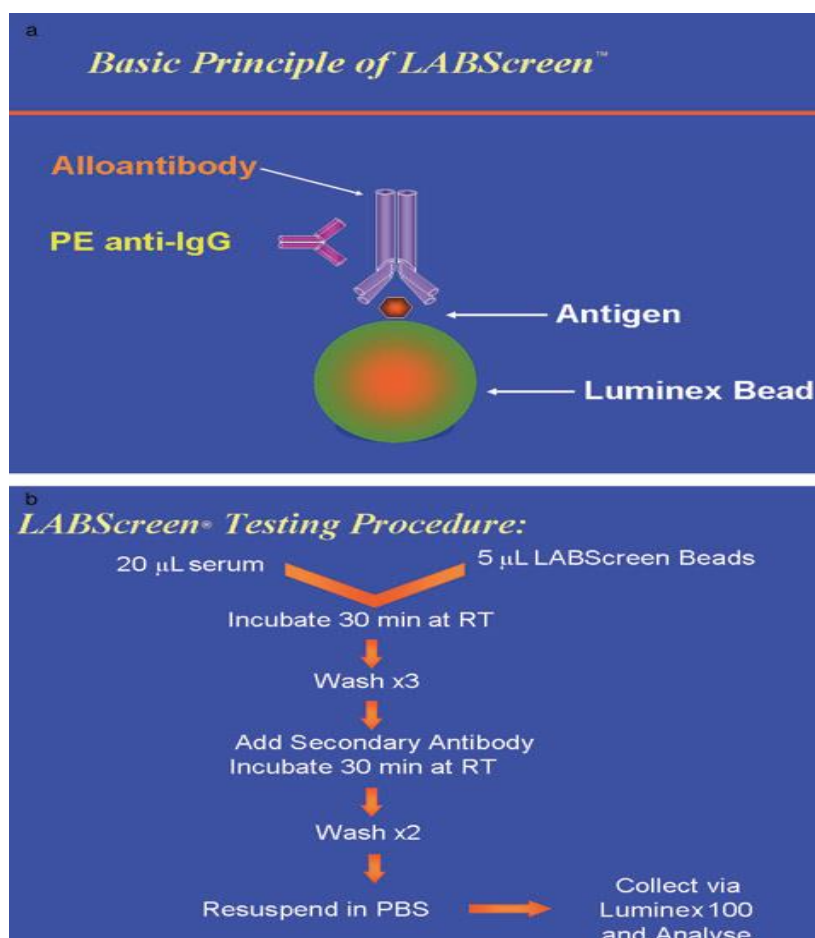
Zmiany histopatologiczne opisywane w cAMR, a indukowane przez przeciwciała, to również obrazy uszkodzenia mikrokrążenia nerkowego, glomerulopatia przeszczepu, mikroangiopatia *de novo* i przyśpieszona miażdżyca. Wyzwaniem w diagnostyce, klasyfikacji i ocenie stopnia zaawansowania cAMR jest fakt, że występowanie i nasilenie cech morfologicznych w biopsji jest zależne od punktu czasowego w przebiegu choroby, a dynamika przebiegu choroby wykazuje dużą zmienność osobniczą. Termin "przewlekły" nie jest związany z konkretnym, określonym czasem po transplantacji (np. > 2 lat), ale wskazuje na stopniowo postępujące w czasie zmiany morfologiczne o charakterze remodelingu, obserwowane w alloprzeszczepie w wyniku urazu wywołanego przez przeciwciała. Objawy kliniczne występujące u pacjentów z późnym cAMR, które może mieć przebieg subkliniczny (rozwijający się niekiedy latami) to przed wszystkim białkomocz, nadciśnienie tętnicze oraz powolny ubytek filtracji kłębuszkowej z obniżającym się eGFR. Dlatego też monitorowanie obecności przeciwciał DSA, wykrywanie C_{4d} *in-situ* i ocena histopatologiczna oraz (współcześnie) dodatkowe analizy molekularne mogą pomóc w ocenie i stopniowaniu aktywności i progresji choroby [11].

Rodzaje przeciwciał DSA i czynniki ryzyka wytworzenia.

Przeciwciała typu DSA mogą występować jeszcze przed transplantacją (ang. *performed DSA*), bądź pojawiają się po przeszczepieniu nerki (*de novo* DSA; dnDSA). Obecność preformowanych DSA wykazuje kliniczny związek z występowaniem wczesnego ostrego odrzucania przeszczepu (< 3 miesiąca po transplantacji), co w przypadku dużego nasilenia tego procesu i jego humoralnego charakteru może skutkować szybką utratą nerki. Odwrotnie, obecność dnDSA,

które mogą pojawiać się stopniowo i późno (po kilku latach) po transplantacji, koreluje z rozwojem późnego przewlekłego odrzucania (cAMR) i przewlekłej glomerulopatii, stąd mają one wpływ na odległe losy przeszczepu [12,17-21].

Do wykrywania przeciwciał anti-HLA używana jest technologia Luminex'u. Metoda ta wykorzystuje serię mikrosfer polistyrenowych (kulek), zawierających fluorochromy o różnej intensywności świecenia. Mikrokulki pokryte są oczyszczonymi antygenami HLA klasy I lub II. Indywidualna fluorescencja mikrokulek umożliwia zróżnicowanie rodzaju antygeny HLA. Surowice testowe dodawane są do mieszanki kulek, a przeciwciała HLA wiążą się z kulką z dołączoną cząsteczką HLA. Następnie dodawane jest drugie, wyznakowane fikoerytryną przeciwciało IgG, które wiąże się z pierwotnym przeciwciałem HLA. Odpowiednie oprogramowanie przetwarza dane z detektorów fluorescencji i przedstawia wynik reakcji w postaci średniej fluorescencji MFI (ang. *mean fluorescence intensity*) każdej mikrokulki opłaszczonej danym antygenem [22,23].



Ryc.1a Podstawowe zasady testu kulkowego Luminex (LABScreen, One Lambda Inc.) [22].

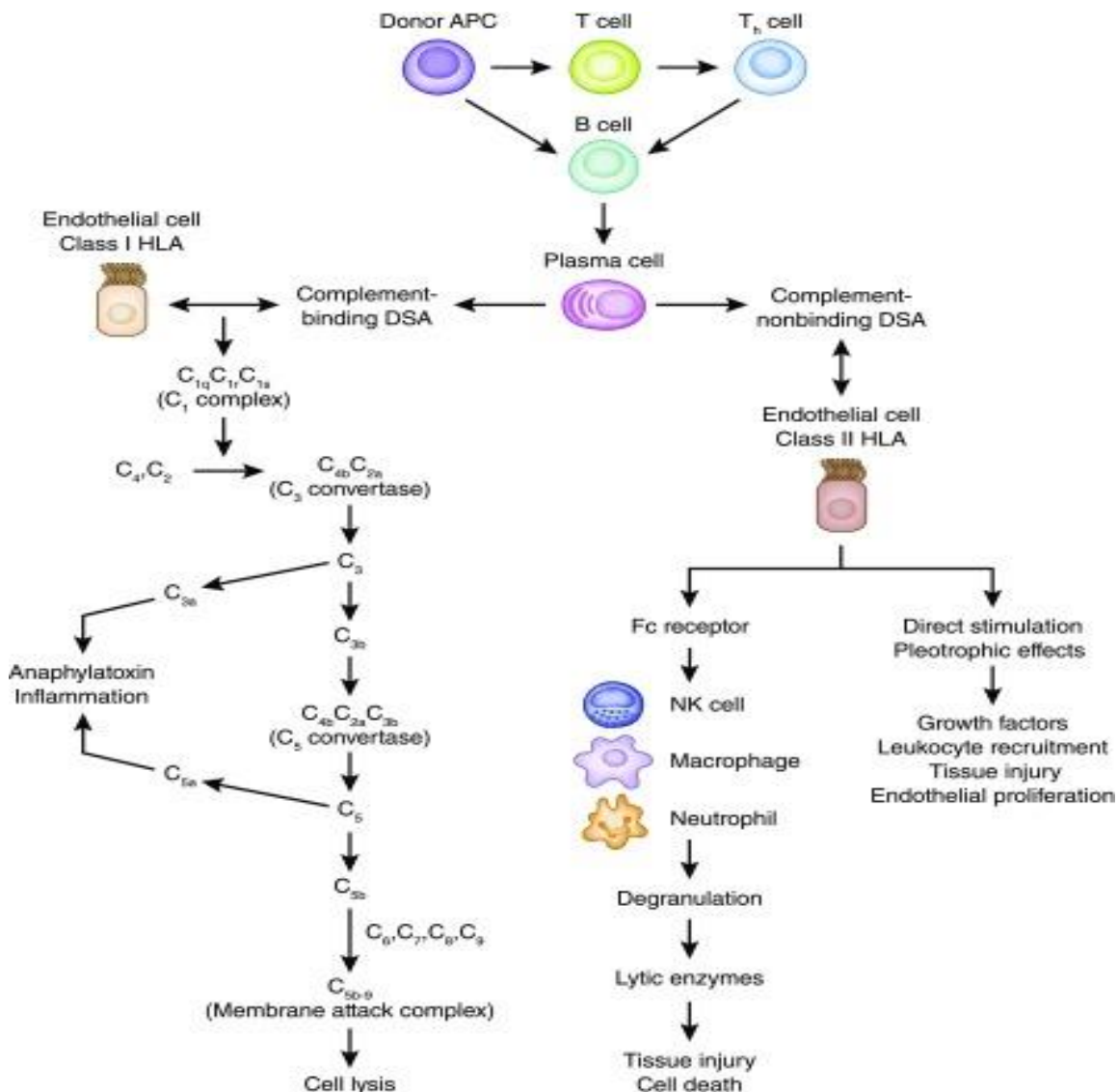
Ryc.1b Etapy związane z przygotowaniem testu do pomiaru przez urządzenie Luminex [22].

Wartość MFI jest proporcjonalna do ilości konkretnego przeciwciała anty-HLA w badanej surowicy i jest pośrednią, półilościową oceną natężenia obecności przeciwciał. Na podstawie wartości MFI można oszacować stopień immunizacji pacjenta i ryzyko rozwoju humoralnego odrzucania [22,24]. Przyjęcie odpowiedniego progu wartości MFI pozwala na dodatkową ocenę znaczenia obecności DSA. Przyjmowane są różne punkty odcięcia (ang. *cut-off*). Zazwyczaj wartość MFI między 2500 i 5000 uznawana jest za „słabą”, wartość między 5000 a 10 000 za „umiarkowaną”, a > 100000 za „wysoką” [25,26]. Taka stratyfikacja jest oparta na wykazanych korelacjach klinicznych, w których dopiero obecność dnDSA o MFI >10 000 wiązała się z częstymi i potwierdzonymi w biopsji nerki przypadkami humoralnego odrzucania [25,26].

Nowsze dane wskazują na potrzebę obniżenia progu MFI uznawanego za ważny klinicznie, bowiem wykazano, że już przy MFI rzędu 2500 istotnie wzrasta obecność pozakomórkowego DNA dawcy (ang. *donor-driven cell free DNA; Dd-cfDNA*), uznawanego za biomarker odrzucania przeszczepu [27,28].

Przeciwciała anty-HLA dzielą się na klasy I i II. Przeciwciała klasy I ukierunkowane są przeciwko antygenom A, B i C, obecnym na wszystkich komórkach jądrowych i należą często do grupy przeciwciał preformowanych, będących podstawą dodatniego wyniku próby krzyżowej (ang. *T-cell positive cross-match*), wykluczającego kwalifikację. O ile pojawią się po transplantacji, to wykrywane są wcześniej (w czasie kilku miesięcy) oraz silnie wiążą układ dopełniacza, co skutkuje korelacją z wcześniej występującymi, burzliwymi epizodami ostrego odrzucania humoralnego (AMR). Przeciwciała klasy II są ukierunkowane przeciwko antygenom DR, DQ i DP, obecnym na komórkach prezentujących antygeny. Wykryte przed transplantacją mogą być podstawą dodatniego wyniku próby krzyżowej z limfocytami typu B (ang. *B-cell positive cross-match*), stanowiącego względne przeciwwskazanie do kwalifikacji. O ile pojawią się po transplantacji (jako dnDSA), to wykrywane są na ogół późno i albo nie wiążą układu dopełniacza, lub robią to słabo. Ich obecność koreluje z późnym (po transplantacji) rozwojem przewlekłego humoralnego odrzucania (cAMR) i w konsekwencji z odległą utratą czynności przeszczepu nerki (po upływie lat) [29]. Dodatkowym, ważnym elementem różnicującym kliniczne znaczenie DSA jest ich zdolność wiązania dopełniacza (ang. *C1q-binding*). Przeciwciała

mające tę cechę wykazują większą „lityczność” i bardziej szkodliwe działanie w odniesieniu do tkanki przeszczepu [30,31].



Ryc. 2 Trzy drogi działania przeciwciał dnDSA prowadzące do rozwoju uszkodzenia tkanek przeszczepu [29].

Wykorzystanie układu dopełniacza przez DSA skutkuje użyciem błonowego kompleksu atakującego tego układu (ang. *membrane attack complex*; C_{5b-9}) do lizy komórek tkanki przeszczepu. Niemniej, niewiązanie układu dopełniacza przez przeciwciała (DSA C_{1q}⁻) nie oznacza ich nieszkodliwości, bowiem wówczas wykorzystują one inne mechanizmy działania, związane z rekrutacją szeregu komórek (poprzez wiązanie ich receptora Fcγ) lub cytokin prozapalnych, co w efekcie także (wtórnie) uszkadza tkankę przeszczepu poprzez lokalne działanie enzymów litycznych uwalnianych przez granulocyty lub poprzez bezpośrednie toksyczne

działanie leukocytów na śródbłonek naczyń przeszczepu i/lub tkankę śródmiąższową nerki [29]. Procesy te mogą mieć burzliwy i ostry przebieg (ostre humoralne odrzucanie) lub przebieg wyciszony klinicznie (subkliniczne humoralne odrzucanie). Oba te wstępne procesy stopniowo mogą prowadzić do rozwoju przewlekłego odrzucania (cAMR), skutkującego powoli postępującym obniżaniem filtracji kłębuszkowej, glomerulopatią i zmianami włóknienia cewek i tkanki śródmiąższowej (ang. *interstitial fibrosis/tubular atrophy*; IF/TA) [32].

Czynnikiem stymulującym produkcję (i późniejsze wykrycie) preformowanych przeciwciał anti-HLA jest ekspozycja ustroju biorcy przeszczepu na obce antygeny (HLA) przy poprzedniej transplantacji, wskutek powtarzanych transfuzji krwi lub (u dorosłych kobiet) wskutek ciąży [33,34]. Z kolei na powstawanie nowych przeciwciał (dnDSA) po przeszczepieniu narządu istotny wpływ ma ograniczenie adekwatności immunosupresji. Jednym z powodów jest nieprzestrzeganie zaleceń lekarskich, które opisywane jest jako najczęstsza przyczyna rozwoju cAMR u młodych dorosłych i młodzieży [35]. Ogólna częstość występowania tego zjawiska w populacji pediatrycznej wynosi około 30%. Priorytetem powinna być wczesna identyfikacja braku adherencji, zwłaszcza w populacji nastolatków, a pacjenci, u których nastąpiła jakakolwiek zmiana lub zmniejszenie immunosupresji, powinni być ściślej monitorowani. Kolejnym czynnikiem jest wymuszona redukcja dawek lub czasowe odstawienie leków immunosupresyjnych, dokonywane w celu ograniczenia ich skutków ubocznych (np. odstawienie steroidów i redukcja inhibitorów kalcyneuryny) [35,36]. Ważnym elementem wpływającym również na zmiany w immunosupresji są infekcje wirusowe. Częstość występowania infekcji wirusowych (tj. CMV, EBV i Polyoma BK) jest wysoka u dziecięcych biorców przeszczepów ze względu na ich naiwność immunologiczną wobec tych wirusów. Zakażenia CMV i EBV mogą być bezpośrednio odpowiedzialne za aktywację immunologiczną prowadzącą do rozwoju dnDSA poprzez wywoływanie poliklonalnej stymulacji odpowiedzi komórek B i T. Ponadto częstym podejściem terapeutycznym w leczeniu wiremii jest okresowe zmniejszenie immunosupresji, co wtórnie również może prowadzić do rozwoju DSA, chociaż sprzyja obniżeniu ryzyka pełnej aktywacji zakażenia [25,37,38,39]. Kolejnym istotnym czynnikiem silnie stymulującym produkcję i obecność przeciwciał anti-HLA jest usunięcie poprzedniego, nieczynnego przeszczepu nerki. Jego obecność w ustroju (mimo braku podstawowej funkcji) jest korzystna w tym rozumieniu, że jego śródbłonek zatrzymują („wchłaniają”) przeciwciała anti-HLA, przez co ich obecność w krążeniu jest minimalizowana.

Usunięcie takiego nieczynnego przeszczepu (korzystne z innych wskazań klinicznych, takich jak niedokrwistość, małopłytkowość, białkomocz i nadciśnienie tętnicze) powoduje szybki wzrost obecności i stężenia przeciwciał anti-HLA w surowicy biorcy, co utrudnia dobór kolejnej nerki. Te przeciwciała mają więc charakter preformowany (przed kolejną transplantacją). Usunięcie nieczynnego graftu oznacza również pełne odstawienie immunosupresji, co również jest czynnikiem stymulującym układ immunologiczny do produkcji przeciwciał anti-HLA [40].

Podstawowym czynnikiem stymulującym powstawanie dnDSA jest słaby dobór tkankowy przeszczepu nerki. Niezgodność w zakresie HLA przy ujemnym wyniku próby krzyżowej nie jest bezwzględnym przeciwwskazaniem do przeszczepienia, niemniej jest przyczyną pobudzenia immunologicznego o późnych konsekwencjach [41-45]. Obecnie coraz częściej dobór narządów do transplantacji polega na dobieraniu epitopów antygenowych, co zwiększa jakość doboru tkankowego w rozumieniu ograniczenia niekorzystnych odległych efektów immunologicznych i klinicznych [46-48].

Innymi podstawowymi czynnikami stymulującymi pojawienie się dnDSA są poprzedzające ten fakt epizody ostrego odrzucania przeszczepu lub niejawnie klinicznie łagodne odrzucanie humoralne [49-50]. Opisywana w piśmiennictwie częstość występowania przeciwciał anti-HLA u biorców przeszczepu nerki jest znacznie zróżnicowana i w zależności od kilku czynników zawiera się między kilkoma, a 100%. Czynniki mające wpływ na to zróżnicowanie to przede wszystkim rodzaj wskazania do wykonania badania wykrywającego przeciwciała. O ile badanie wykonywane jest ze wskazań klinicznych, czyli późno po transplantacji, przy pogorszeniu czynności przeszczepu sugerującym cAMR, to w serii takich oznaczeń (u kolejnych chorych) częstość występowania DSA może sięgać 80-100%. Z kolei jeśli badanie jest wykonywane przesiewowo, począwszy od dnia transplantacji, w określonych protokołem odstępach czasu (najpierw co kilka miesięcy, a potem lat), to częstość występowania DSA może być niska (kilkuprocentowa) we wczesnym okresie po transplantacji, ale z czasem może narastać. Tak więc drugim podstawowym elementem wpływającym na potwierdzenie i wzrost częstości występowania dnDSA jest upływ czasu od transplantacji; im dłuższy – tym większe prawdopodobieństwo wykrycia dnDSA. W pewnym uśrednieniu, wartości odsetka częstości występowania dnDSA w badaniach prospektywnych, z czasem obserwacji do 5 lat, sięgają 21-27% [51,52].

Wpływ leczenia immunosupresyjnego na wytwarzanie przeciwciał DSA

Dane na temat wpływu podstawowej immunosupresji na zahamowanie powstawania DSA sugerują podstawowe znaczenie takrolimusu, jako składnika złożonej immunosupresji. W kilku opracowaniach poświęconych temu zagadnieniu wykazano, że przy porównaniu stężenia przed kolejną dawką (C_0 TAC), jego wartość była wyższa u chorych niewytwarzających DSA w porównaniu z pacjentami produkującymi przeciwciała, niemniej wartości wskazane jako optymalne były różne, od ok. 5 ng/mL do >7 ng/mL, w zależności od typu transplantacji (dawcy spokrewnieni vs zmarli) i różnych innych czynników ryzyka, w tym między innymi zakresu niedobrania epletów HLA. To ostatnie wskazuje na znaczenie suboptymalnego doboru tkankowego dla potrzeby utrzymywania wyższego (niż przy optymalnym doborze) stężenia TAC [53-57]. Jednym z parametrów sprzyjających powstawaniu DSA jest istotna zmienność stężenia takrolimusu we krwi, co m.in. ma być także dowodem na nieprzestrzeganie zaleceń co do regularnego przyjmowania leków immunosupresyjnych (ang. *non-adherence*) [58-61]. Z innego opracowania wynika, że dla ryzyka powstawania dnDSA ważnym czynnikiem, niezależnym od samej zmienności stężenia takrolimusu, jest także długość czasu pozostawiania jego stężenia poniżej dolnego progu wartości referencyjnych (w tym przypadku < 8 ng/mL). O ile tak było przez więcej niż ok 40 % czasu obserwacji – to ryzyko było istotnie wyższe [62]. Opublikowano także odmienne dane, negujące bezpośredni efekt wysokiej zmienności stężenia C_0 TAC w czasie 3-letniej obserwacji na rozwój przewlekłego humoralnego odrzucania [63].

Trzeba podkreślić, że podstawowa immunosupresja jest zazwyczaj trójlekowa, stąd należy brać pod uwagę możliwość skumulowanego wpływu trzech leków (takrolimusu, prekursora kwasu mykofenolowego i steroidów) na układ immunologiczny (w tym zdolność produkcji DSA). Jedna z analiz oceny wpływu mykofenolanu mofetylu (stosowanego jak składnik trójlekowej immunosupresji) wykazała, że u pediatrycznych pacjentów, którzy wytworzyli DSA, średnia dawka MMF była istotnie niższa (371 vs 617 mg/m²/d; p= 0.035), a towarzyszyło temu istotne pogorszenie czynności przeszczepu nerki, choć bez cech humoralnego odrzucania [64]. Podjęto także próbę analizy znaczenia obniżenia dawki steroidów (stosowanych w trójlekowej immunosupresji) dla ryzyka powstawania dnDSA, wykazując, że przy stosowaniu najniższych dawek (< 10 mg prednisonu dziennie), częstość wykrywania

dnDSA istotnie wzrastała[65]. Relacji między wielkością dawki, czy wręcz samym faktem podawania steroidów, a podwyższonym ryzykiem produkcji DSA przeczą dane z badań ze stosowaniem schematów bezsteroidowych, gdzie przy zachowaniu odpowiedniego reżymu podawania pozostałych leków – częstość wykrywania dnDSA była podobna do tej, jaką stwierdza się u chorych stale przyjmujących steroidy (to jest <25%) [66].

Jak dotąd nie opublikowano wyników prób odniesienia skumulowanej siły kilkulekowej immunosupresji do skuteczności zapobiegania powstawaniu przeciwciał anty-HLA. Niemniej stworzono wskaźnik skojarzonej siły kilkulekowej immunosupresji, wyrażający jej działanie (wyliczone z wielkości dawek) jedną liczbą. Pierwotnie opisany przez Vasudeva i wsp. wskaźnik [67], został następnie zmodyfikowany dla potrzeb pediatrycznych, poprzez odniesienie poszczególnych wartości do wielkości powierzchni ciała [68]. Jego zasadę przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Zmodyfikowany wskaźnik Vasudeva obrazujący siłę kilkulekowej skojarzonej immunosupresji [68].

Lek	Wskaźnik pediatryczny Dawka na jednostkę (mg/m²/dobę)	Jednostka siły immunosupresji
Takrolimus	1,2	1
Cyklosporyna A	58	1
Syrolimus	1,2	1
Mykofenolan mofetylu	290	1
Azatiopryna	58	1
Prednizon	2.9	1

Hipoteza badawcza:

Trójlekowa immunosupresja zawierająca takrolimus (TAC), mykofenolan mofetylu (MMF) i prednizon (Pred) (TAC+MMF+Pred) stosowana zgodnie z przyjętym schematem dawkowania i utrzymywanie stężenia TAC z w zakresie referencyjnym – zapobiega powstawaniu *de novo* przeciwciał swoistych dla niezgodnych antygenów dawcy (dnDSA) u dziecięcych biorców przeszczepu nerki z grupy niskiego/ umiarkowanego ryzyka immunologicznego.

Uzasadnienie hipotezy badawczej

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 danych 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) badanie w kierunku DSA wielokrotnie potwierdzało ich obecność, której towarzyszyły zmiany z biopsji typu cAMR.

Z tego powodu w obecnej pracy podjęto temat oceny retro- i prospektywnej częstości występowania DSA, w zależności od wskazań do tego badania, od czasu po transplantacji, 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.

Cele pracy

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:

Grupa badana

Badaniem objęto wstępnie 85 pacjentów (n=85) poniżej 18 r.ż po zabiegu przeszczepienia nerki będących pod opieką Kliniki Nefrologii Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego w Instytucie Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka. Kryterium włączenia do badania było potwierdzenie niskiego lub umiarkowanego ryzyka immunologicznego [9,10] oraz stosowanie trójlekowej immunosupresji bez indukcji lekiem biologicznym.

Kryterium włączenia do analizy

W grupie retrospektywnej kryterium włączenia do badania było stwierdzenie obecności DSA w dowolnym (wyznaczonym wskazaniami klinicznymi) czasie po transplantacji.

W grupie prospektywnej kryterium włączenia do badania był zabieg przeszczepienia nerki połączony z zaplanowanym protokołem pobrań krwi na ocenę obecności dnDSA oraz udział takrolimusu w podstawowej, wyjściowej immunosupresji.

Kryterium wyłączenia z analizy

Z analizy zostało wykluczonych 18 chorych. Kryteriami wyłączenia była:

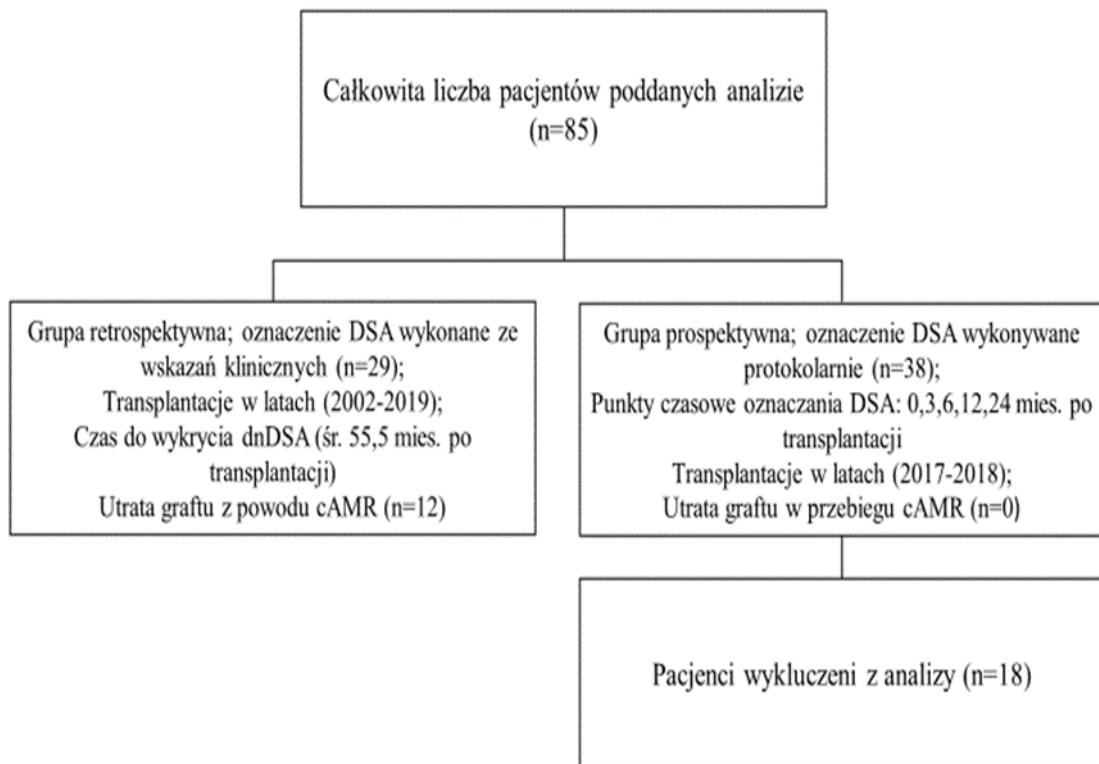
- obecność DSA preformowanych przed przeszczepieniem (n=8)
- wczesne <3 mies. przekazanie pacjenta pod opiekę innego ośrodka (n=4)
- wczesna utrata przeszczepu (w czasie hospitalizacji związanej z transplantacją) (n=1)
- zgon pacjenta (n=1)
- ukończony 18 r.ż w czasie < roku obserwacji (n=4)

Ostateczną liczbę 67 chorych podzielono na dwie odrębne grupy:

I. grupa retrospektywna- (n= 29), czas obserwacji w latach 2002 – 2019, w której wykonywano oznaczenie przeciwciał DSA tylko ze wskazań klinicznych (to znaczy - z powodu istotnego pogorszenia czynności przeszczepu nerki).

II. grupa prospektywna- (n=38) czas obserwacji 2017-2019, w której oznaczenia DSA wykonywane było protokolarnie, w kolejnych punktach czasowych do 2 lat po przeszczepieniu nerki, niezależnie od stanu klinicznego

Podział na grupy, powody wykluczenia z analizy oraz protokół obserwacji chorych przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 3. Schemat kwalifikacji, dyskwalifikacji i protokół obserwacji chorych.

Tabele źródłowe, zawierające szczegółowe dane demograficzne, kliniczne i laboratoryjne wszystkich pacjentów znajdują się jako suplement - na końcu pracy.

Czasowe punkty badań dla grupy prospektywnej:

- oznaczenie obecności dnDSA w punkcie 0 (w dniu transplantacji), oraz po 3, 6, 12 i 24 miesiącach od przeszczepienia,
- ocena stężenia C₀ takrolimusu w odstępach czasowych 1, 3, 6, 12, 18 i 24 miesięcy po transplantacji oraz ocena wskaźnika zmienności stężenia C₀ takrolimusu (wyliczany na podstawie wszystkich kolejnych stężeń C₀) 1 i 2 lata po transplantacji,
- ocena wartości wskaźnika siły immunosupresji wg zmodyfikowanej skali Vasudeva po upływie 1 mies. a następnie po 1 roku i 2 latach od transplantacji.

Punkty oceny w grupie retrospektywnej:

- ocena stężenia kreatyniny z wyliczeniem eGFR po upływie 2 lat po transplantacji, na 2 lata i 1 rok przed wykryciem dnDSA oraz w momencie wykrycia dnDSA,
- ocena stężenia C₀ takrolimusu we wszystkich oznaczeniach wykonanych w okresie 2 lat przed wykryciem dnDSA oraz ocena wskaźnika zmienności stężenia C₀ takrolimusu (wyliczony na podstawie wartości tych stężeń),
- ocena wartość wskaźnika siły immunosupresji wg zmodyfikowanej skali Vasudeva po upływie 2 lata po transplantacji, na 2 lata i 1 rok przed wykryciem dnDSA oraz w momencie wykrycia dnDSA,

Przyjęte wartości referencyjne stężenia inhibitorów kalcyneuryny zgodne ze schematem immunosupresji stosowanym w Centrum Zdrowia Dziecka [3].

Za zakres terapeutyczny stężenia we krwi wartości przed kolejną dawką (C₀) w pierwszym miesiącu po przeszczepieniu przyjęto:

- dla takrolimusu (TAC 10-15 ng/ml w czasie pierwszego miesiąca, 10-12 ng/ml pomiędzy 2-6 miesiącem i 5-10 ng/ml > 6 miesiąca po przeszczepieniu.

Mykofenolan mofetylu (MMF) podawano w dawce 600 mg/m² dwa razy na dobę, zmniejszonej do 300 mg/m² dwa razy na dobę po upływie pierwszego miesiąca po przeszczepieniu u pacjentów leczonych TAC.

Prednizon podawano w dawkach zmniejszanych kolejno co tydzień: 60-30-15-9-6 mg/m², zmniejszanych następnie co tydzień do dawki podtrzymującej 0,1 mg/kg/dobę.

Parametrem oceny czynności przeszczepionej nerki było stężenie kreatyniny w surowicy i wyliczenie szacowanego wskaźnika przesączania kłębuszkowego (eGFR) wg zmodyfikowanej formuły Schwartz'a [69].

Kryterium rozpoznania istotnego pogorszenia funkcji nerek, był wzrost stężenia kreatyniny w surowicy o 30% w stosunku do wartości wyjściowej w dwóch kolejnych oznaczeniach, przy jednoczesnym wykluczeniu innych przyczyn klinicznych, takich jak zastój moczu, zakażenie układu moczowego i wysokie stężenie inhibitora kalcyneuryny tj. takrolimusu we krwi.

Zakres analizowanych danych:

- charakterystyka biorcy: wiek, płeć, masa ciała i wzrost w momencie transplantacji, rozpoznanie choroby podstawowej, kolejność transplantacji, antygeny HLA A, B, DR, liczba niezgodnych antygenów z dawcą.
- schemat immunosupresji – leki podawane w leczeniu immunosupresyjnym oraz ich zmiany w trakcie obserwacji.
- zmienność stężeń tacrolimusu CV (%) wyliczono wg następującego równania:
 - $CV(\%) = (\sigma/\mu) \times 100$gdzie σ jest odchyleniem standardowym, a μ jest średnim stężeniem takrolimusu we wszystkich oznaczeniach [61].
- ocena punktacji wskaźnika RIS-DSA- obliczona poprzez przyporządkowanie skali punktowej do wartości MFI DSA zgodnie z tabelą 4 [26].

Tabela 4. Wskaźnik RIS-DSA [26]

Punkty	Wartość DSA (MFI)
0	Nieobecność DSA
2	Niska wartość DSA (MFI 2500-5000)
5	Umiarkowana wartość DSA (MFI 5000-10000)
10	Wysoka wartość DSA (MFI >10000)

- wartość PRA (ang. *panel reactive antibodies*)- wartość PRA (%) z ostatniego oznaczenia przed transplantacją
- niezgodne HLA (ang. *Human Leukocyte Antygen*)- liczba niezgodnych antygenów w układzie HLA A, B, DR z dawcą

Metodyka laboratoryjna:

- stężenie kreatyniny w surowicy oznaczano testem Alinity c Creatinine na analizatorze firmy Abbott,
- eGFR dla wszystkich biorców w wieku <18r.z. wyliczano z uproszczonego wzoru Schwartz, w którym $eGFR (ml/min/1,73m^2) = 0,413 \times \text{wzrost (cm)} / \text{stężenie kreatyniny w surowicy (mg/dl)}$ [69],

- stężenie TAC oznaczano ilościowo we krwi pełnej metodą chemiluminescencyjną z wykorzystaniem odczynników firmy Abbott [70], zakres referencyjny- indywidualny dla każdego pacjenta i zależny od przyjętego schematu immunosupresji
- antygeny HLA oznaczano metoda PCS SSO (Labtype SSO),
- obecność przeciwciał PRA oznaczano testem mikrolimfocytotoksycznym (metodą serologiczną CDC) [71],
- ocenę obecności i (pośrednio) miano przeciwciał wyrażone jako MFI (ang. *Mean Fluorescence Intensity*) wykonana przy użyciu testu Labscreen Mixed (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) i metody Luminex. Określenia specyficzności antygen(ów) badano przy użyciu One Lambda Labscreen Single anty-Class I i/lub anty-Class II [21,22].

Wszystkie testy przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta

- biopsje nerki oceniano w patomorfologicznej skali Banff [11], zawierającej jakościową i półilościową ocenę zmian w poszczególnych obszarach nerki:
zmiany zapalne - zapalenie cewek (tubulitis) (t), ostre zapalenie śródmiaższowe (i), zapalenie błony wewnętrznej tętnic (endarteritis) (v), zapalenie kapilar kłębuszkowych (glomerulitis) (g), zapalenie kapilar okołocewkowych (peritubular arteritis; PTC-itis);
zmiany przewlekłe- włóknienie zrębu (ci), zanik cewek (ct), arterioskleroza (cv), przewlekła glomerulopatia przeszczepu (cg), szkliwienie arterioli (ah).

Metody analizy statystycznej:

W pracy zastosowano metody statystyki opisowej i wnioskowania statystycznego. Posługiwano się pakietem statystycznym SAS oraz arkuszem kalkulacyjnym Excel.

Statystyki opisowe

W przypadku zmiennych ilościowych, takich jak stężenie leku, punktacja Vasudeva, wiek, wysokość i masa ciała, eGFR oraz długość czasu do wystąpienia dnDSA, badano zmienną pod kątem ustalenia, czy spełnione są założenia rozkładu normalnego. W tym celu oceniano zbieżność średniej i mediany, wartości skośności i kurtozy, symetryczność histogramu, a także wykonywano test Kołmogorowa-Smirnowa [72]. W przypadku zmiennych kategoriowych, takich jak przydział do grupy, płeć, fakt wytworzenia dnDSA, potwierdzony w biopsji epizod odrzucania przeszczepu, przynależność do grupy spadku eGFR poniżej 30% wartości

wyjściowych, przedstawiano liczebności i procentowe udziały poszczególnych kategorii w postaci tabel kontyngencji. W przypadku zmiennych ilościowych, których rozkład jest normalny lub zbliżony do normalnego (średnia i mediana równe sobie, niskie wartości kurtozy i skośności, symetryczny histogram, wartość p w teście Kołmogorowa-Smirnowa >0.05), prezentowane są średnie i odchylenia standardowe, a w przypadku zmiennych, które nie spełniają założeń rozkładu normalnego – mediany oraz kwartył pierwszy i trzeci.

Wnioskowanie statystyczne

W przypadku zmiennych, które cechowały się rozkładem normalnym zastosowano testy parametryczne (test T Studenta), [73] a w przypadku niespełnienia założeń testu parametrycznego – testy nieparametryczne (test Mann-Whitney) [74]. Dla zbadania zależności między zmiennymi kategorycznymi stosowano test chi kwadrat niezależności, lub w przypadku małych liczebności (liczebność poniżej 5 w polu tabeli kontyngencji), dokładny test Fishera [73]. W analizie pomiarów powtarzanych na osi czasu, takich jak kolejne stężenia leku i kolejna punktacja Vasudeva, ze względu na współzależność pomiarów (niespełnienie założenia o niezależności) zastosowano mieszany model liniowy (linear mixed model) [75]. Współczynnik zmienności obliczono dzieląc odchylenie standardowe przez średnią (arytmetyczną).

W grupie prospektywnej, w zależności od przynależności do podgrupy pacjentów, którzy wytworzyli dnDSA i grupy pacjentów, którzy nie wytworzyli DSA, prawdopodobieństwo utrzymania funkcji nerki, mierzonej wartością eGFR powyżej 70% wartości wyjściowej, szacowano metodą Kaplana-Meiera [76]. Do testowania hipotezy równości dwóch krzywych przeżycia zastosowano statystykę log-rank.

Czas do spadku eGFR o 30% (lub więcej) wartości wyjściowej między pacjentami, którzy rozwinęli, lub nie DSA, porównano stosując model proporcjonalnego ryzyka Coxa. Do porównania dwóch grup zależnych (wartości powiązane) wyników Vasudev'a użyto testu znakowanych rang Wilcoxa [77].

Wyniki:

1. Dane opisowe grupa prospektywna i grupa retrospektywna.

Wyniki analizy wieku oraz zgodności antygenów HLA w podziale na grupę prospektywną oraz retrospektywną przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Analiza zgodności antygenów HLA

	Grupa prospektywna (n=38)	Grupa retrospektywna (n=29)	p
	Mediana (Q1-Q3)	Mediana (Q1-Q3)	
	n (%)	n (%)	
Wiek (lata)	11.4 (8.0- 14.5)	8.1 (5.0- 9.9)	0.002*
Niezgodności HLA-DR 0/1/2/3	8 / 25 / 5 (21 / 66 / 13)	5 / 13 / 11 (17 / 45 / 38)	0.06**
Niezgodności HLA- B 0/1/2/3	2 / 19 / 17 (5 / 50 / 45)	1 / 15 / 13 (3 / 52 / 45)	1**
Niezgodności HLA- A 0/1/2/3	4 / 19 / 15 (11 / 50 / 39)	3 / 14 / 12 (10 / 48 / 41)	1**
Suma niezgodności HLA A+ B +DR	4 (3-4)	4 (3-5)	0.3*

HLA (ang. *Human Leukocyte Antigens*)- antygeny zgodności tkankowej, grupy A,B i DR

Q1, dolny kwartył; Q3, górny kwartył; * test Manna Whitney; ** test Fishera

W analizowanej grupie mediana wieku pacjentów w grupie prospektywnej wynosiła około 11 lat natomiast w grupie retrospektywnej około 8. Więcej niż 3 z 6 niezgodnych antygenów HLA (czyli kryterium szacowanego średniego ryzyka immunologicznego) w grupie prospektywnej występowało u 23 pacjentów (60%) natomiast w grupie retrospektywnej u 17 (58%). Łącznie

niezgodności wszystkich antygenów HLA A + B + DR nie różniły się istotnie statystycznie w obu grupach (mediana 4 vs. 4; $p = 0,3$; test Manna-Whitneya).

Rozkład częstości poszczególnych jednostek choroby podstawowej będącej przyczyną schyłkowej niewydolności nerek w poszczególnych grupach został przedstawiony w tabeli 6.

Tabela 6. Rozkład częstości poszczególnych jednostek choroby podstawowej

Choroba podstawowa	Grupa prospektywna(n=38) n (%)	Grupa retrospektywna(n=29) n (%)
Wada układu moczowego	15 (39%)	13 (29%)
Torbielowatość nerek	4 (11%)	2 (17%)
Kłębuszkowe zapalenie nerek	3 (8%)	2 (7%)
Nefronoftyza	3 (8%)	0
Zespół nerczycowy	1 (3%)	5 (17%)
Zespół hemolityczno-mocznicy	1 (3%)	1 (3%)
Przyczyna nieustalona	4 (10%)	0
Inne	7 (18%)	6 (21%)

Główną przyczyną schyłkowej niewydolności nerek w obydwu grupach pacjentów były wady układu moczowego, w grupie prospektywnej 39% vs 29% w grupie retrospektywnej.

Rozkład częstości stosowania poszczególnych leków immunosupresyjnych oraz zmiany leczenia w obydwu grupach zostały przedstawione w tabeli 7.

Tabela 7. Rozkład częstości stosowania poszczególnych leków immunosupresyjnych

Immunosupresja	Grupa prospektywna n=38) n (%)	Grupa retrospektywna (n=29) n (%)	p
Prednizon	38 (100%)	29 (100%)	N/A
Takrolimus	31 (82%)	25 (86%)	0.75**
Cyklosporyna	7 (18%)	7 (24%)	0.57***
Mykofenolan mofetylu	37 (97%)	25 (86%)	0.16**
Azatiopryna	3 (8%)	1 (3%)	0.62**
Sirolimus	0	7 (24%)	0.002**
Zmiana schematu immunosupresji	7 (18%)	9 (31%)	0.26**

N/A nie wykonywano

** test Fishera *** test chi-kwadrat

Zdecydowana większość pacjentów otrzymywała kombinację TAC (82% w grupie prospektywnej vs. 86% w grupie retrospektywnej), MMF (97% w grupie prospektywnej vs 86% w grupie retrospektywnej), oraz Pred (100% w obu grupach). Nie wykazano istotnych różnic w rozkładzie podstawowych leków, to jest inhibitorów kalcyneuryny i mykofenolanu mofetylu (MMF) w obu grupach. Zmiana schematu immunosupresji była spowodowana działaniami niepożądanymi leków, bądź koniecznością zwiększenia (po potwierdzeniu odrzucania) lub zmniejszenia siły immunosupresji (zakażenia wirusowe). Częstość dokonywania zmiany nie była istotnie różna w obu grupach. Jediną istotną różnicą było częstsze stosowanie syrolimusu w grupie retrospektywnej.

Czas obserwacji, czynność nerki przeszczepionej po miesiącu od zabiegu przeszczepienia (wyjściowy eGFR) oraz częstość wykrywania dnDSA w grupie prospektywnej oraz retrospektywnej przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Długość obserwacji, wyjściowa czynność nerki (wyrażona jako eGFR) oraz odsetek częstości występowania dnDSA po transplantacji

	Grupa prospektywna(n=38) Mediana (Q1-Q3) n (%)	Grupa retrospektywna(n=29) Mediana (Q1-Q3) n (%)	p
Czas obserwacji (lata)	2 (2-2)	8 (6-11)	<0.0001*
Wyjściowy eGFR (ml/min/1,73m ²)	76.4 (70.3- 99.5)	72.8 (53.6- 93.1)	0.27*
Częstość wykrycia dnDSA(%) po transplantacji łącznie	21	100	N/A
po 3 miesiącach (%)	8	N/A	N/A
po 6 miesiącach (%)	11	N/A	N/A
po 12 miesiącach (%)	16	N/A	N/A
po 24 miesiącach (%)	21	N/A	N/A

N/A, nie oznaczano

* test Manna Whitneya

Długość obserwacji chorych należących do grupy retrospektywnej była istotnie wyższa, niż obserwacji grupy prospektywnej (8 vs 2 lata, $p < 0.001$, test Manna Whitneya). W grupie prospektywnej wyjściowa czynność nerki (po miesiącu od przeszczepu), wyrażona jako mediana szacowanej wartości przesączania kłębuszkowego (eGFR) wyniosła 76.4 vs 72.8 ml/min/1.73m² dla grupy retrospektywnej (NS). W związku z tym że kryterium kwalifikacji do grupy retrospektywnej było potwierdzenie obecności DSA, ich występowanie w tej grupie wynosiło 100% i nie był porównywane z danymi co do częstości występowania dnDSA w grupie prospektywnej, gdzie takie kryterium nie obowiązywało.

Końcowa (w całej 2-letniej obserwacji) częstość występowania dnDSA grupie prospektywnej wyniosła 21%, niemniej narastała ona stopniowo i regularnie wraz z czasem po transplantacji i wynosiła odpowiednio 8% po 3, 11% po 6, 16% po 12 i 21% po 24 miesiącach obserwacji. Klasy, stężenie i typ przeciwciał dnDSA w obydwu grupach chorych przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Klasy, stężenie (MFI) i typ przeciwciał dnDSA w obydwu grupach chorych

dnDSA (+)	Klasa I	Klasa II	Klasa I i II	MFI < 3000	C_{1q}+
grupa prospektywna (n=8)	25%	75%	-	100%	1 przypadek
grupa retrospektywna (n=29)	28%	52%	20%	27%	niedostępne

W grupie prospektywnej w każdym przypadku MFI wynosiło <3000, w jednym przeciwciała miały charakter „inwazyjny” tj. wiązały składową dopełniacza C_{1q}(DSA C_{1q}).

Na podstawie wartości MFI DSA dla obydwu grup chorych wyliczono wartość wskaźnika RIS-DSA (szacującego prawdopodobieństwo wystąpienia humoralnego odrzucania) [26]. Wśród pacjentów dnDSA(+) grupy prospektywnej mediana wartości tego wskaźnika wynosiła 2, a u pacjentów dnDSA(+) należących do grupy retrospektywnej 13.

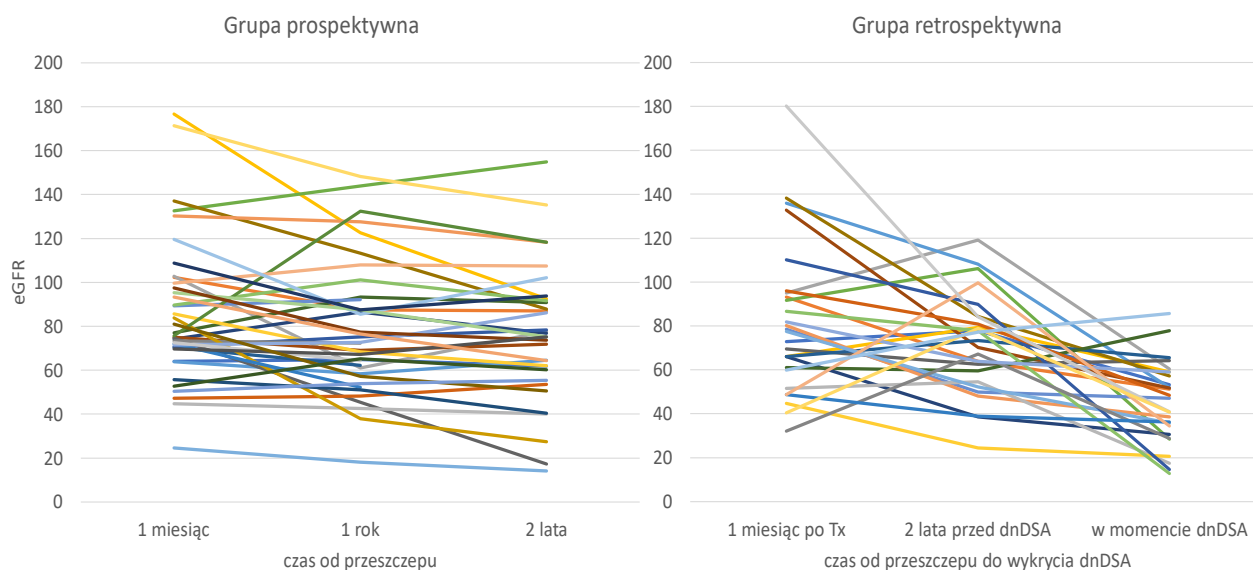
Czynność nerki przeszczepionej w momencie wykrycia dnDSA, częstość wykonywania biopsji nerki przeszczepionej, częstość potwierdzenia odrzucania w biopsji oraz utraty nerki przeszczepionej w przebiegu cAMR w grupie prospektywnej oraz retrospektywnej przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Czynność nerki przeszczepionej w momencie wykrycia dnDSA, częstość wykonywania biopsji nerki przeszczepionej, częstość potwierdzenia odrzucania w biopsji oraz utraty nerki przeszczepionej w przebiegu cAMR w obu grupach.

	Grupa prospektywna	Grupa retrospektywna	P
	Mediana (Q1-Q3)	Mediana (Q1-Q3)	
	n (%)	n (%)	
eGFR w momencie wykrycia dnDSA (ml/min/1,73m ²)	85.0 (55.0-92.5)	41.0 (28.7- 57.2)	0.004*
Liczba pacjentów u których wykonano biopsję nerki	10 (26.3)	23 (79.3)	<0.0001 ***
Częstość odrzucania potwierdzonego biopsją	7 (18)	19 (66)	<0.0001 **
Częstość utraty nerki	0	12 (41)	<0.0001 **

* test Manna Whitneya ** test Fishera *** test chi-kwadrat

W grupie prospektywnej wśród pacjentów u których wykryto dnDSA w badaniach przesiewowych, mediana eGFR w momencie ich stwierdzenia wyniosła 85 ml/min/1.73m². W grupie retrospektywnej, gdzie badanie w kierunku DSA wykonywano ze wskazań klinicznych (czyli przy pogorszeniu czynności przeszczepu) wartość eGFR wynosiła 41 ml/min/1.7m² i była istotnie niższa w porównaniu z wartością stwierdzaną w grupie prospektywnej (p=0.004; test Manna Whitneya). Dynamikę zmian wartości eGFR w trakcie obserwacji, w obu grupach, przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 3. Zmiany wartości eGFR w trakcie obserwacji pacjentów z grupy prospektywnej i retrospektywnej

W grupie retrospektywnej istotnie częściej występowały wskazania do biopsji nerki (79.3 vs 26.3 %, $p < 0.0001$; test chi kwadrat) i odpowiednio istotnie częściej wykrywano w niej ostre odrzucanie przeszczepu (ang. *biopsy-proven rejection*) (70 vs 18%, $p < 0.0001$; test Fishera). O ile w grupie prospektywnej nie było przypadku utraty przeszczepu, to w grupie retrospektywnej częstość ta wynosiła 41% ($p < 0.0001$; test Fishera).

Zmiany stwierdzone z biopsji nerki w grupie prospektywnej oraz retrospektywnej przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Rozkład zmian histopatologicznych wykrywanych w biopsji nerki w obu grupach

Zmiany histopatologiczne w biopsji	Grupa prospektywna (n=10) n (%)	Grupa retrospektywna (n= 23) n (%)
Ostre odrzucanie śródmiąższowe	7 (70)	4 (18)
cAMR	0	15 (66)
Cechy infekcji wirusowej	1 (10)	1 (4)
Przewlekła glomerulopatia	0	2 (8)
Bez zmian	2 (20)	1 (4)

cAMR (ang. *chronicantibodymediatedrejection*) – przewlekłe odrzucanie humoralne

U pacjentów z grupy prospektywnej, gdzie wskazania do biopsji występowały rzadko (18%), w ocenie histopatologicznej bioptatów nerki pobranych w momencie pogorszenia czynności nerki przeszczepionej stwierdzano w większości zmiany o charakterze ostrego odrzucania śródmiąższowego w 70%, natomiast u żadnego z pacjentów nie stwierdzono zmian o charakterze przewlekłego humoralnego odrzucania (cAMR), ani innych zmian przewlekłych. U pacjentów z grupy retrospektywnej przeważały zmiany o charakterze cAMR u 66% chorych, a ostre odrzucanie śródmiąższowe zostało potwierdzone u 18% chorych. Dodatkowo u 8% chorych z tej grupy występowały zmiany o charakterze nieswoistej glomerulopatii (nie wchodzące w skład pełnego rozpoznania cAMR). Na wyniki te niewątpliwie m.in. miał wpływ dłuższy czas między transplantacją, a wykonaniem biopsji: 59.02 miesięcy w grupie retrospektywnej vs 6.86 w grupie prospektywnej ($p < 0.0001$; test Manna Whitneya). Dalsza obserwacja tych chorych wykazała, że u 41% średnio po upływie 2,4 roku od wykazania obecności dnDSA doszło do utraty czynności przeszczepu nerki.

Tabela 12. Długość czasu od transplantacji do momentu wykonania biopsji nerki

Czas do biopsji	Grupa prospektywna n=38	Grupa retrospektywna n=29
Miesiąc, Mediana (Q1-Q3)	6.86 (1.35-10.84)	59.02 (35.07- 85.57)

2. Analiza porównawcza w obrębie grupy prospektywnej z uwzględnieniem podziału na pacjentów z obecnymi i nieobecnymi dnDSA.

W dalszej części analizy porównywano wybrane parametry kliniczne i farmakologiczne w obrębie 2 podgrup, w zależności od obecności lub nieobecności przeciwciał (dnDSA (+) vs dnDSA(-)). Stosowane leczenie immunosupresyjne oraz zmiany leczenia w grupie prospektywnej z ujemnymi i dodatnimi dnDSA przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Rozkład udziału procentowego poszczególnych leków immunosupresyjnych w podgrupach DSA (+) i DSA (-).

Immunosupresja	Grupa dnDSA (-) n=30 n (%)	Grupa dnDSA (+) n=8 n (%)	p
Prednizon	30 (100%)	8 (100%)	N/A
Takrolimus	24 (80%)	7 (88%)	p=1**
Cyklosporyna	6 (20%)	1 (13%)	p=1**
Mykofenolan mofetylu	30 (100%)	7 (88%)	p=0.21**
Azatiopryna	3 (10%)	0	p=1**

Sirolimus	0	0	N/A
Zmiana schematu immunosupresji	6 (20%)	1 (12%)	p=0**

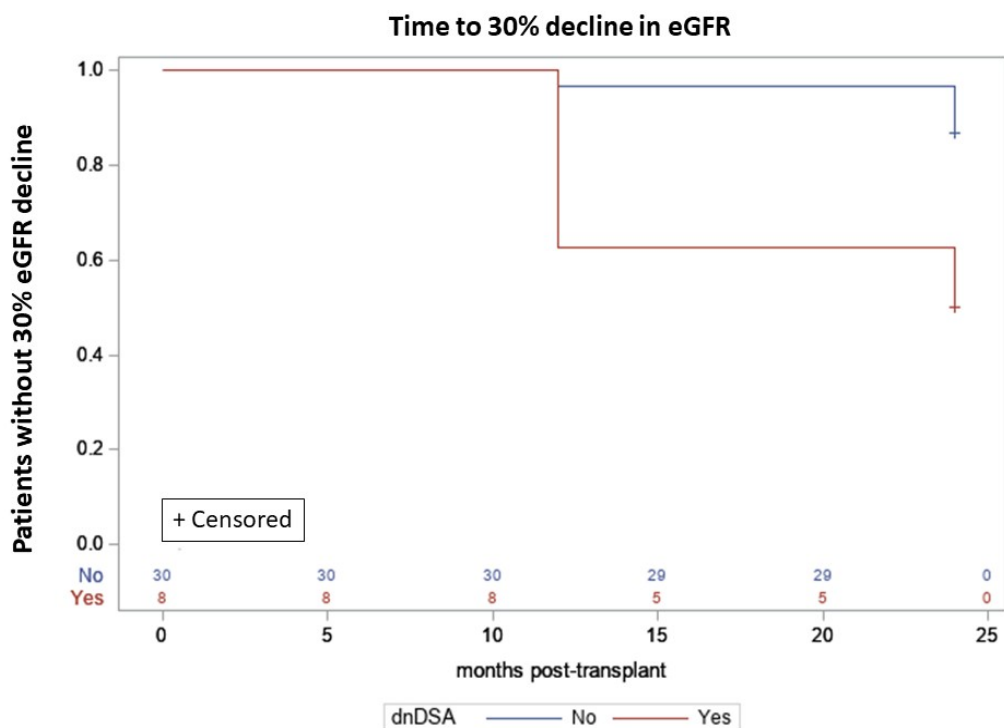
** test Fishera

Dominującym schematem immunosupresji w obydwu grupach był schemat trójlekowy, oparty na jednoczesnym stosowaniu prednizonu (100%), takrolimusu (80 i 88%) oraz mykofenolanu mofetylu (100 i 88%). Zmiana schematu immunosupresji miała miejsce u 20% pacjentów z podgrupy dnDSA (-) oraz 12% z dnDSA (+), polegała na zamianie mykofenolanu mofetylu na azatioprynę lub zamiany takrolimusu na cyklosporynę z powodu istotnych działań niepożądanych ww. leków.

Analiza znaczenia dnDSA dla czynności przeszczepu nerki.

Następnie poddano analizie wpływ pojawienia się dnDSA na czynność przeszczepu nerki. Za parametr progowy przyjęto obniżenie się wartości wyjściowej eGFR o $\geq 30\%$. Jest to parametr stosowany w praktyce klinicznej ośrodka do ustalenia wskazań do hospitalizacji i różnicowania przyczyn dysfunkcji nerki, w tym do wykonania biopsji, o ile jednoznacznie nie ustalono innych przyczyn tego stanu, niż podejrzenie odrzucania przeszczepu.

Wartość eGFR jaką wzięto do analizy (u chorych należących do obydwu podgrup) pochodziła z badania wykonanego po 1 miesiącu, a następnie po 12 miesiącach i po 2 latach po transplantacji, a w grupie pacjentów która wytworzyła dnDSA również w momencie ich wykrycia. Wykazano, że obecność dnDSA wiązała się z $>4,5$ wyższym ryzykiem pogorszenia funkcji przeszczepu, wyrażonej jako przewlekły spadek eGFR o $\geq 30\%$ od wartości wyjściowej w ciągu 2-letniej obserwacji; (skorygowany współczynnik zagrożenia [aHR] 4,37; 95% CI, 1,058-18,038; p = 0,0415; log-rank test). Współczynnik ryzyka skorygowano o takie parametry, jak wiek w chwili transplantacji, zgodność HLA oraz wyjściową wartość eGFR. Zależność tę przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 4. Prawdopodobieństwo spadku wielkości eGFR o $\geq 30\%$ od wartości wyjściowej w podgrupach dnDSA (+) i dnDSA (-) pacjentów należących do grupy prospektywnej, skorygowane o wiek w momencie transplantacji, wyjściowy eGFR i niezgodne antygeny HLA A + B + DR, (log rank $p = 0,0129$).

Analiza związków między nasileniem immunosupresji, a powstawaniem dnDSA

Analizę tę podzielono na trzy części:

- ocenę wpływu stężenia takrolimusu na powstawanie dnDSA
- ocenę wpływu zmienności stężenia takrolimusu na powstawanie dnDSA
- ocenę wpływu siły skumulowanej trójlekowej immunosupresji, wyrażonej jako współczynnik Vasudeva w modyfikacji pediatrycznej na powstawanie dnDSA.

Analizowano związek między podstawowym w praktyce klinicznej, najniższym stężeniem takrolimusu (synonimy: C_0 ; ang. *trough level*; stężenie przed podaniem kolejnej dawki), a częstością występowania dnDSA w grupie prospektywnej. Celem zwiększenia wiarygodności tej oceny, do analizy wzięto wartości wszystkich oznaczeń C_0 TAC ze wszystkich dostępnych badań wykonywanych między pierwszym a 24 miesiącem po transplantacji. Odrzucono wyniki oznaczeń wykonanych w pierwszym miesiącu ze względu na ich znacząco wyższe wartości, wynikające z protokołu immunosupresji. Po uśrednieniu wszystkich dostępnych wyników

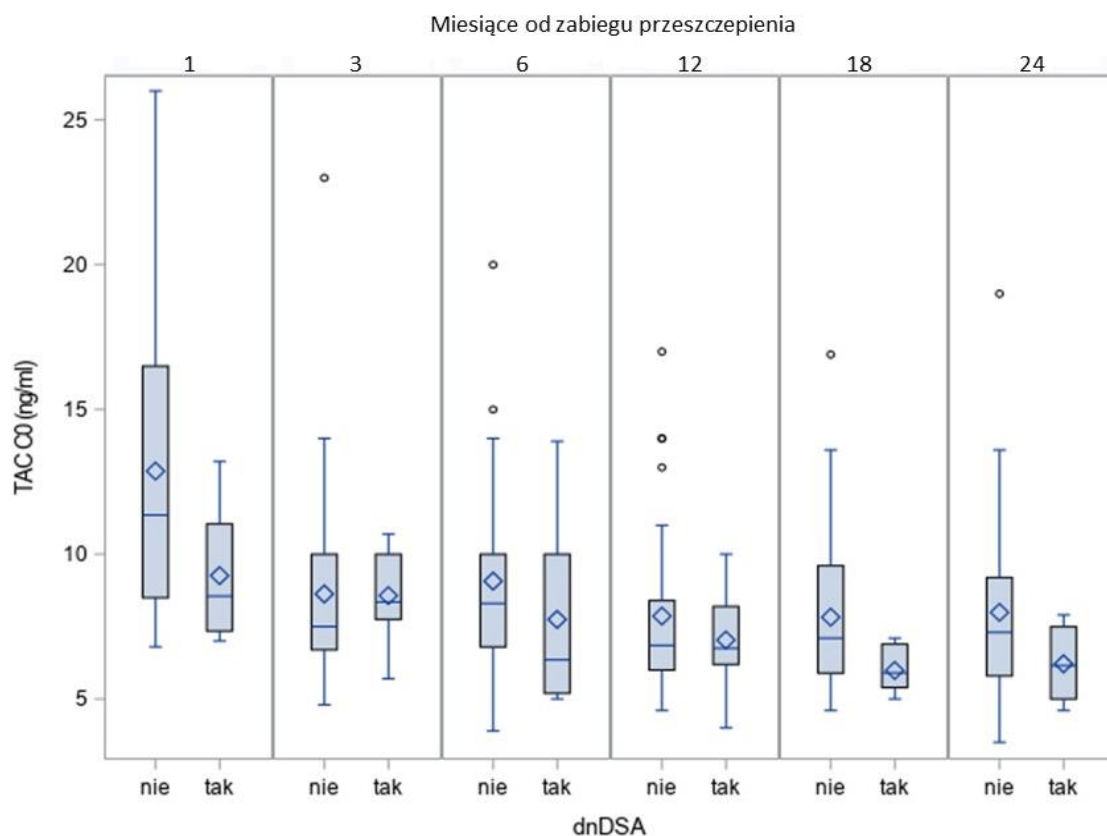
wykazano, że wartości mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) we wszystkich kolejnych ocenach między 1. a 24. miesiącem po transplantacji były istotnie wyższe u pacjentów dnDSA (-), w porównaniu do chorych DSA (+), odpowiednio 7.9 vs 7.1 (p=0.088; *linear mix model test*).

Wynik przedstawia tabela 14 oraz rycina 5.

Tabela 14. Wartości mediany C₀ TAC w zależności od obecności/nieobecności dnDSA w 2-letniej obserwacji.

Parametr	dnDSA (-)	dnDSA (+)	p
TAC C ₀ (ng/ml), mediana (Q1-Q3)	7.9 (6.5- 10.3)	7.1 (5.9- 8.5)	0.0088 [^]

[^] liniowy model mieszany



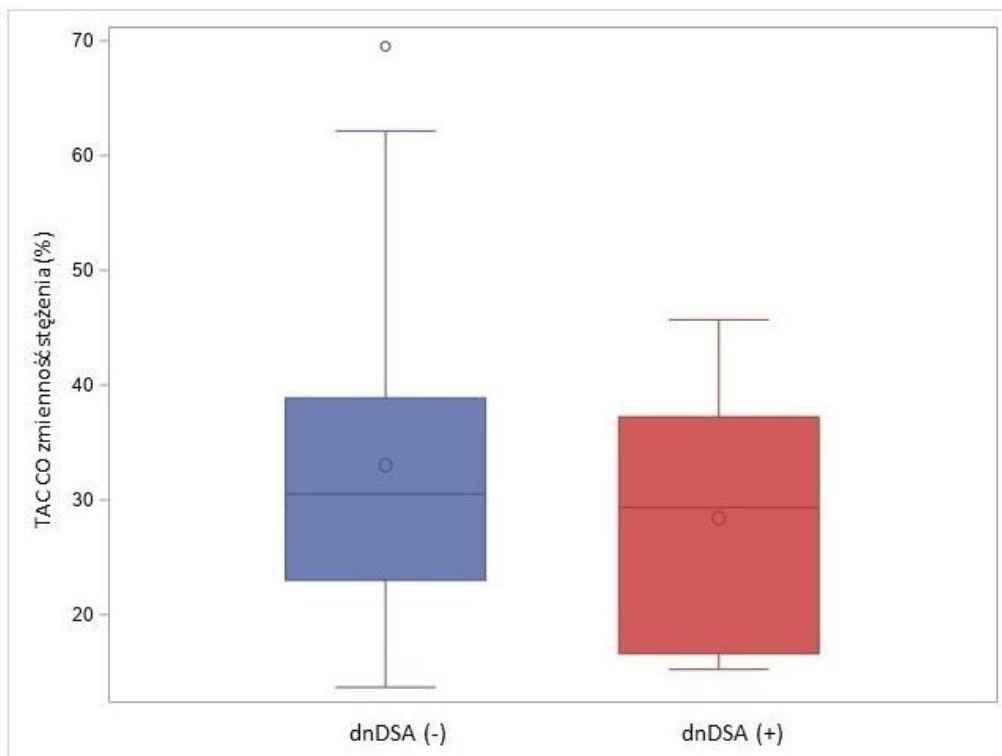
Rycina 5. Analiza mediany stężenia TAC C₀ w okresie dwóch lat od transplantacji u pacjentów dnDSA (-) oraz dnDSA (+)

Następnie analizie poddano związek wartości wskaźnika zmienności stężenia C_0 TAC z obecności/nieobecnością dnDSA. Metodologię obliczania tego wskaźnika oparto na odpowiedniej publikacji [61]. Do obliczeń ponownie użyto wartości wszystkich oznaczeń C_0 TAC ze wszystkich dostępnych badań wykonywanych między pierwszym a 24 miesiącem po transplantacji. Analiza wartości współczynnika zmienności TAC C_0 nie wykazała istotnej różnicy w jego zakresie między pacjentami dnDSA (-) i dnDSA (+) (31 vs. 29; $p = 0,56$). Dane przedstawiono w tabeli 15 i na rycinie 6.

Tabela 15. Porównanie wartości wskaźnika zmienności stężenia TAC C_0 u chorych dnDSA(-) i dnDSA (+).

Parametr	dnDSA (-)	dnDSA (+)	p
TAC C_0 zmienność stężenia (%), mediana (Q1-Q3)	31 (23-39)	29 (17-37)	0.56**

** test Fishera



Rycina 6. Analiza wartości wskaźnika zmienności stężenia TAC C_0 u chorych dnDSA(-) i dnDSA (+).

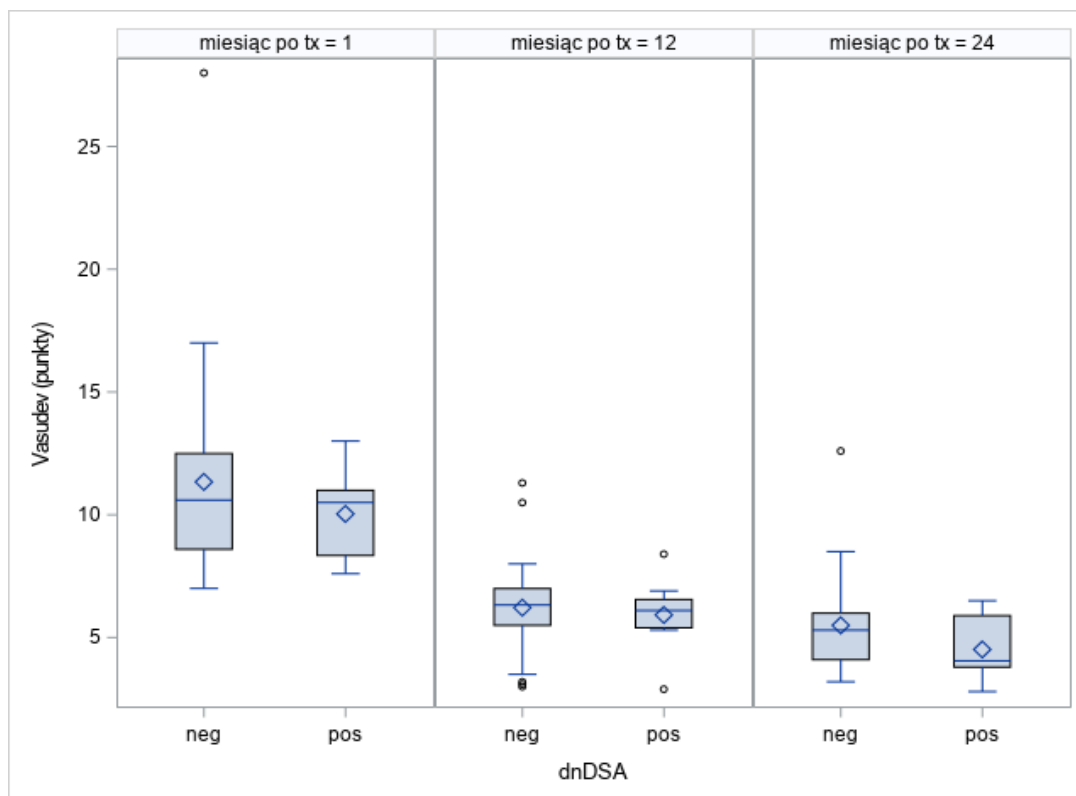
Następnie dokonano analizy znaczenia skumulowanego wskaźnika trójlekowej immunosupresji wg. Vasudeva, w wersji przystosowanej dla pacjentów pediatrycznych [68] dla powstawania dnDSA. Dane do obliczenia wskaźnika Vasudeva (rodzaj i wielkość dawki leku) pobrano z dokumentacji medycznej, w czasie 1, 12 i 24 miesiąca od transplantacji. Analiza wskaźnika Vasudeva, mimo numerycznie niższych wartości w czasie 1 i 2 lat po transplantacji w grupie dnDSA(-), nie wykazała istotnej różnicy w porównywanych grupach. Dane przedstawia tabela 16 oraz rycina 7.

Tabela 16. Porównanie wartości wskaźnika Vasudeva między pacjentami dnDSA (-) i dnDSA(+) w 2 letniej obserwacji.

	Wskaźnik Vasudeva, mediana (Q1-Q3)		p
	dnDSA (-)	dnDSA (+)	
1 miesiąc po transplantacji	10.6 (8.6-12.5)	10.5 (8.4-11.0)	NS [^]
12 miesięcy po transplantacji	6.3 (5.5-7.0)	6.1 (5.4- 6.6)	NS [^]
24 miesiące po transplantacji	5.5 (4.1-6.0)	4.1 (3.8-5.9)	NS [^]

NS- nieznamienne statystycznie

[^]liniowy model mieszany



Rycina 7. Porównanie wartości wskaźnika Vasudeva między pacjentami dnDSA (-) i dnDSA(+) w 2 letniej obserwacji.

3. Analiza porównawcza wybranych wskaźników pomiędzy pacjentami z grupy prospektywnej a retrospektywnej.

Ze względu na różne kryterium przynależności do grupy retrospektywnej (ocena dnDSA tylko ze wskazań klinicznych) i prospektywnej (ocena dnDSA przesiewowa, niezależnie od stanu klinicznego) bezpośrednie porównanie niektórych parametrów nie było możliwe, niemniej dokonano częściowej analizy wybranych czynników, celem wykazanie czy większy upływ czasu od transplantacji do wykonanie badania w kierunku dsDSA oraz uzależnienie wykonania tego badania od dodatkowych wskazań miało znaczenie kliniczne.

Analiza porównawcza nasilenia immunosupresji w grupie retro- i prospektywnej

- porównanie stężenia takrolimusu (TAC C₀).

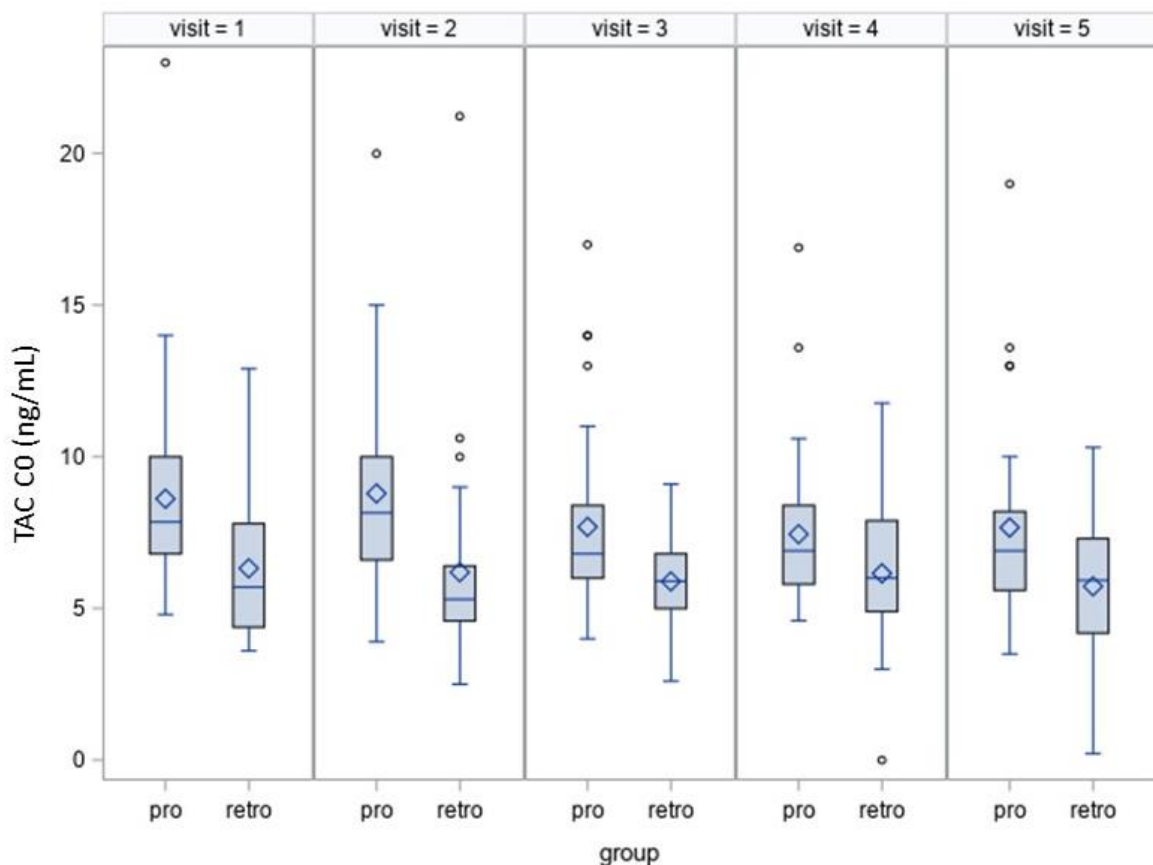
Do obliczeń wykorzystano wszystkie wartości stężenia TAC C₀ zmierzone powyżej 1 miesiąca po transplantacji, w okresie 2 lat prospektywnej obserwacji pacjentów należących do grupy prospektywnej oraz wszystkie wartości stężenia TAC C₀ zmierzone u pacjentów należących do grupy retrospektywnej w okresie 2 lat poprzedzających pierwsze wykrycie dnDSA. Ten dobór

czasu oraz nieco większa częstość pobrań (wizyt) w grupie prospektywnej (typowa dla obserwacji zwłaszcza w pierwszym roku po transplantacji) sprawiły, że liczba próbek analizowanych w grupie prospektywnej wynosiła 181, a w grupie retrospektywnej 145. Wykazano, że wartość mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) w oznaczeniach pomiędzy 3. a 24. miesiącem po transplantacji w grupie prospektywnej i w oznaczeniach w czasie dwóch lat poprzedzających wytworzenie dnDSA u pacjentów grupy retrospektywnej była istotnie wyższa w grupie prospektywnej i wynosiła 7.3 vs 5.6 (p<0.0001 ; *linear mixed model*). Dane te przedstawia tabela 17 i rycina 8.

Tabela 17. Porównanie mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) między grupą prospektywną i retrospektywną w dwuletniej obserwacji

Parametr	Grupa prospektywna (ilość oznaczeń n=181)	Grupa retrospektywna (ilość oznaczeń n=145)	p
TAC C ₀ (ng/ml), mediana (Q1-Q3)	7.3 (6- 9.2)	5.6 (4.6-7.4)	<0.0001 [^]

[^]liniowy model mieszany



Rycina 8. Mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) w grupie prospektywnej i retrospektywnej, w dwuletniej obserwacji.

Następnie, wykorzystując te same wyniki oznaczeń stężenia TAC C₀, porównano wartość współczynnika zmienności stężenia leku w okresie dwuletniej obserwacji. Wykazano, że wartość ta, oceniana w okresie dwóch lat poprzedzających wytworzenie dnDSA w grupie retrospektywnej była wyższa w porównaniu do grupy prospektywnej (30 vs 23%), ale tylko na granicy istotności statystycznej (p=0.056; mixedlinear model). Dane przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 18. Wartości współczynnika zmienności stężenia takrolimusu (C₀) w okresie dwuletniej obserwacji, w grupie prospektywnej i retrospektywnej.

Parametr	Grupa prospektywna (ilość oznaczeń n=181)	Grupa retrospektywna (ilość oznaczeń n=145)	p
TAC C ₀ zmienność stężenia (%), mediana (Q1-Q3)	23 (17-32)	30 (24-31)	0.056 [^]

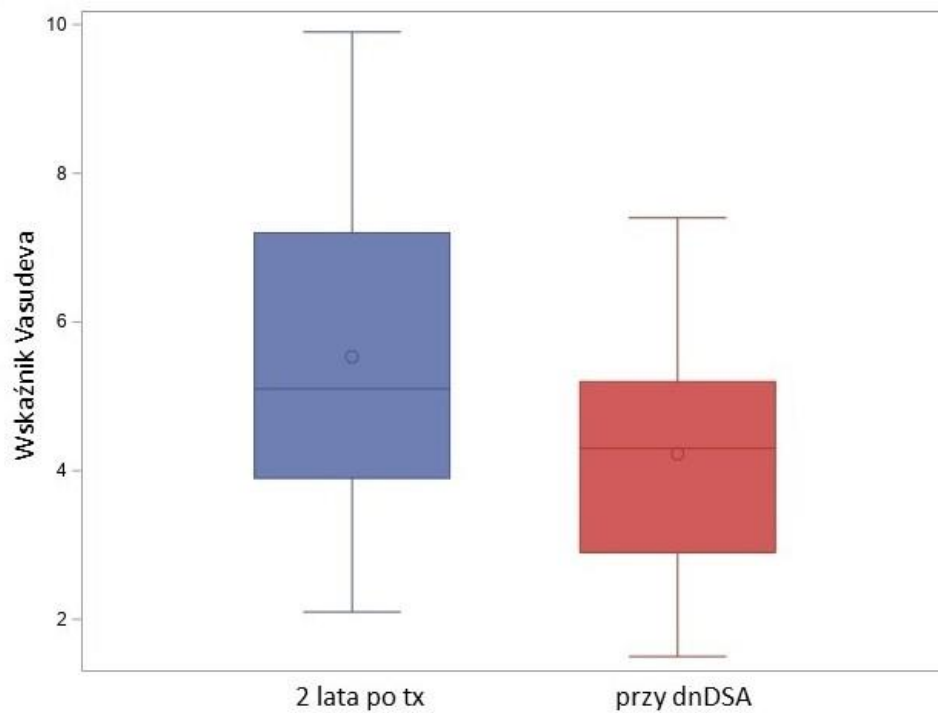
[^]liniowy model mieszany

Następnie dokonano analizy dynamiki zmian wartości wskaźnika skumulowanej siły immunosupresji (Vasudeva) w grupie retrospektywnej w okresie poprzedzającym wykrycie dnDSA. Wykazano, że wartości występujące 2 lata po transplantacji były istotnie wyższe od wartości występujących w momencie wykrycia dnDSA (5.1 vs 4.3 p <0.0001, test znakowanych rang Wilcoxa). Dane przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Wartości wskaźnika skumulowanej siły immunosupresji (Vasudeva) w grupie retrospektywnej w okresie poprzedzającym wykrycie dnDSA.

Wskaźnik Vasudeva, mediana (Q1-Q3)	Grupa retrospektywna
2 lata po transplantacji	5.1 (3.9- 7.2)
2 lata przed wykryciem dnDSA	4.3 (3.8- 6.9)
1 rok przed wykryciem dnDSA	4.0 (3.4- 6.7)
W momencie wykrycia dnDSA	4.3 (2.9-5.2)

Zależność pomiędzy wartościami wskaźnika Vasudeva dwa lata po transplantacji a wskaźnikiem w momencie wykrycia dnDSA w grupie retrospektywnej przedstawia Rycina 9.

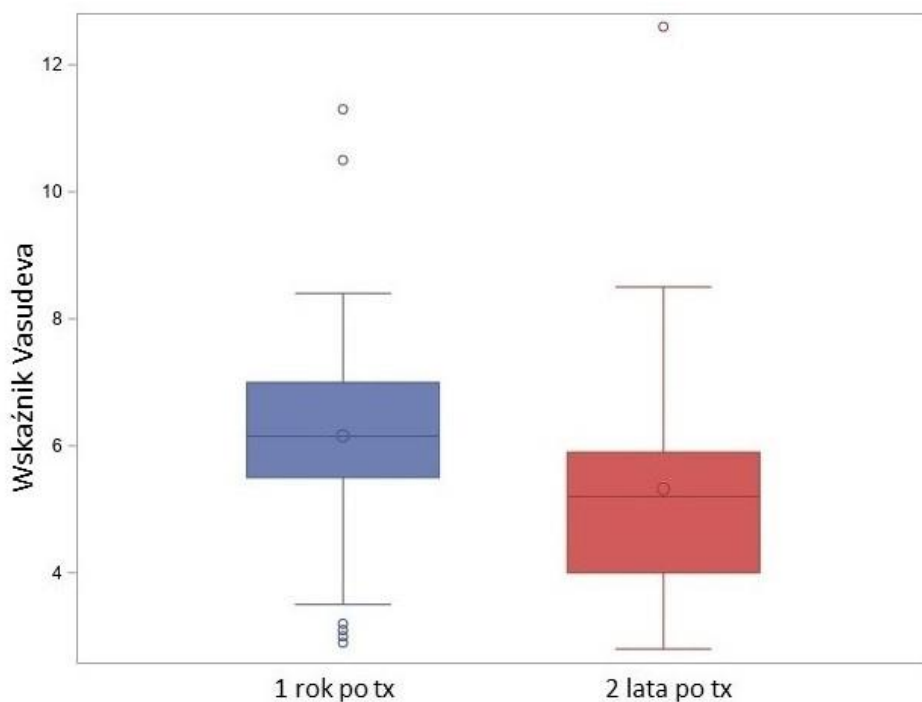


Rycina 9. Wartości wskaźnika Vasudeva dwa lata po transplantacji i w momencie wykrycia dnDSA w grupie retrospektywnej.

Podobnie, w grupie prospektywnej wykazano, że wartości wskaźnika Vasudeva po upływie 1 roku od transplantacji były istotnie wyższe, niż po 2 latach 6.2 vs 5.2; $p= 0.0004$, (test znakowanych rang Wilcozona). Wyniki przedstawiono w tabeli 20 i rycine 10.

Tabela 20. Wartości wskaźnika Vasudeva po 1 i 2 latach od transplantacji w grupie prospektywnej.

Wskaźnik Vasudeva, mediana(Q1-Q3)	Grupa prospektywna
1 rok po transplantacji	6.2 (5.5- 7.0)
2 lata po transplantacji	5.2 (4.0-5.9)



Rycina 10. Wartość wskaźnika Vasudeva rok i dwa lata po transplantacji w grupie prospektywnej.

Ze względu na różny czas obserwacji nie porównywano tych parametrów między grupami. Występująca spadkowa tendencja zmian (w obu grupach) z upływem czasu jest naturalnym efektem wynikającym z protokołów immunosupresji (im dalej w czasie od transplantacji, tym niższa siła immunosupresji).

4. Analiza porównawcza stężeń TAC C₀ pomiędzy pacjentami dnDSA(-) i dnDSA(+) niezależnie od przynależności do grupy

Dokonano oddzielnej analizy między pacjentami dnDSA(-) i dnDSA(+) (niezależnie od przynależności do grupy) w zakresie porównania mediany stężeń TAC C₀ (wyliczonej ze wszystkich 326 oznaczeń analizowanych poprzednio).

Wykazano, że wartość mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) u pacjentów dsDNA (-) była istotnie wyższa, niż u chorych dnDSA (+) ; odpowiednio 7.4 vs 6.0 ($p < 0.0001$; *linear mixed model*). Dane przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Wartości mediany stężeń TAC C₀ u chorych dnDSA (-) i dnDSA (+) niezależnie od przynależności do grupy

Parametr	Grupa prospektywna dnDSA (-) (liczba oznaczeń n=145)	Grupa prospektywna i retrospektywna dnDSA (+) (liczba oznaczeń n=181)	p
TAC C ₀ (ng/ml), mediana (Q1-Q3)	7.4 (6.2- 9.5)	6.0 (4.8-7.6)	<0.0001 [^]

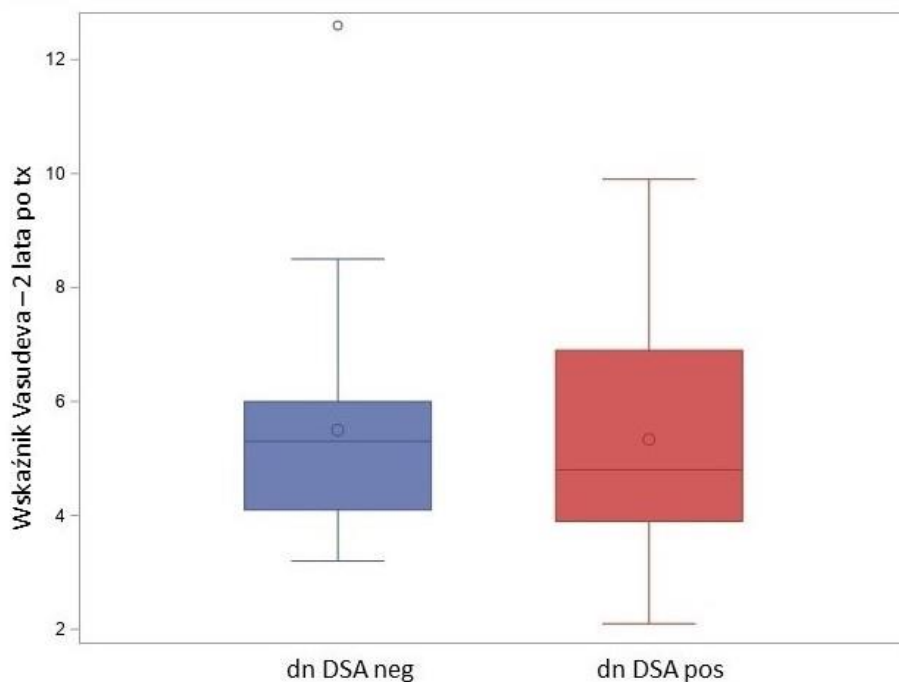
[^]liniowy model mieszany

Następnie porównano wskaźniki Vasudeva w obydwu grupach. Poddano analizie wspólny punkt łączący obie grupy, tj. wskaźnik Vasudeva po dwóch latach od transplantacji, nie wykazując istotności statystycznej pomiędzy grupami, (p=0.73; test Manna Whitneya). Dane przedstawiono w tabeli 22 i na rycinie 11.

Tabela 22. Porównanie wskaźnika Vasudeva dwa lata po transplantacji w grupach z negatywnymi i pozytywnymi dnDSA.

Parametr	Grupa prospektywna dnDSA (-)	Grupa prospektywna i retrospektywna dnDSA (+)	p
Wskaźnik Vasudeva 2 lata po transplantacji, mediana (Q1-Q3)	5.3 (4.1-6.0)	4.8 (3.9- 6.9)	0.73 ^{**}

^{**} test Fishera



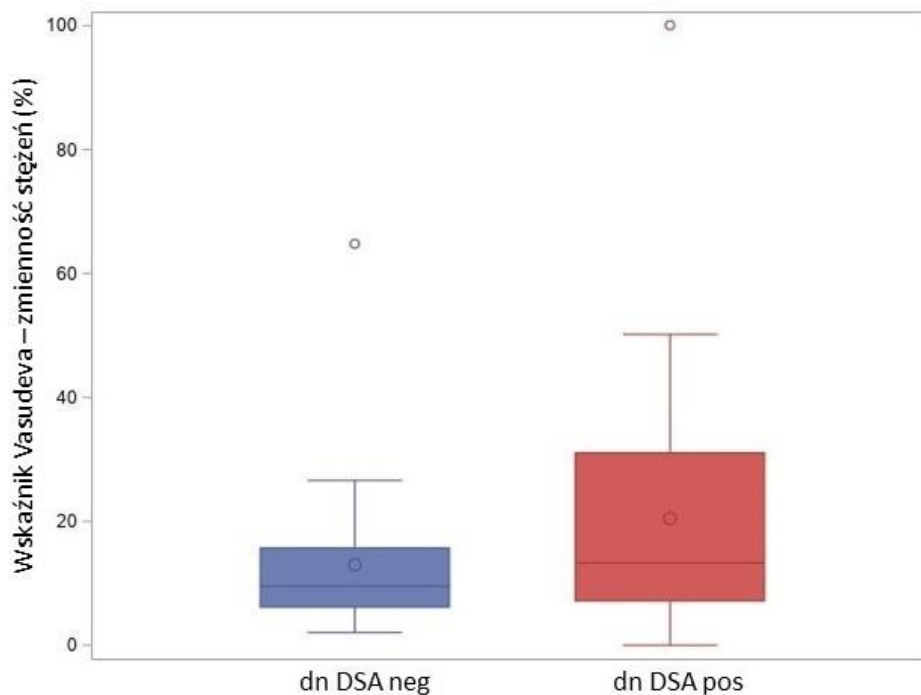
Rycina 11. Wskaźnika Vasudeva dwa lata po transplantacji w grupach chorych z obecnymi i nieobecnymi dnDSA.

Aby ujednolicić ocenę siły immunosupresji w obydwu grupach przeanalizowano zmienność wskaźnika Vasudeva w czasie. Do obliczeń posłużono się wzorem, który używano do wyliczenia zmienności stężeń takrolimusu [68]. W grupie chorych bez obecności dnDSA użyto do analizy wskaźnika Vasudeva po roku i dwóch latach od transplantacji, natomiast u pacjentów z obecnymi dnDSA grupy prospektywnej po roku, dwóch latach od transplantacji i w momencie wykrycia dnDSA, a u pacjentów grupy retrospektywnej z obecnymi dnDSA- dwa lata, rok przed wykryciem oraz w momencie wykrycia dnDSA. Zmienność wskaźnika Vasudeva w grupie pacjentów, którzy nie wytworzyli dnDSA była mniejsza (10% vs 13%) niż w grupie pacjentów z obecnymi dnDSA, ale różnica ta nie była istotna statystycznie. Wskazujeto na fakt, że u pacjentów którzy nie wytworzyli przeciwciał rzadziej dochodziło do zmian dawkowania leków immunosupresyjnych (wykazywali się oni bardziej stabilnymi stężeniami leków w surowicy). Dane przedstawiono w tabeli 23 i na rycinie 12.

Tabela 23. Zmienność wskaźnika Vasudeva w grupach pacjentów bez dnDSA oraz w grupie z obecnymi dnDSA.

Parametr	Grupa prospektywna dnDSA (-)	Grupa prospektywna i retrospektywna dnDSA (+)	p
Zmienność wskaźnika Vasudeva(%), Mediana (Q1-Q3)	10 (6- 16)	13 (7- 31)	0.12**

** test Fishera



Rycina 12. Zmienność wskaźnika Vasudeva w grupach pacjentów bez obecności dnDSA oraz w grupie z obecnymi dnDSA.

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 prawdopodobieństwo wystąpienia humoralnego odrzucania u dzieci po transplantacji nerki 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) 7.9 vs 7.1ng/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 u 5.5 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) 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 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 dnDNA (-) (liczba próbek 145) była istotnie wyższa, niż u chorych dnDSA (+) (liczba próbek 181); odpowiednio 7.4 vs 6.0 ($p < 0.0001$).

Dyskusja

Obecność przeciwciał anty-HLA, zwłaszcza tych powstających *de novo* po transplantacji (dnDSA) jest jednym z podstawowych czynników mających jednocześnie:

- znaczenie predykcyjne dla oceny odległego rokowania (utrzymania czynności przeszczepionej nerki);
- znaczenie diagnostyczne pomocne w rozpoznawaniu humoralnego odrzucania przeszczepu;
- znaczenie kliniczne, jako pośredni wskaźnik skuteczności immunosupresji.

Mimo tej wiedzy, znanej z wielu publikacji opisujących wybrane populacje chorych dorosłych oraz (osobno) pacjentów pediatrycznych po transplantacji nerki, w tym zwłaszcza pacjentów uczulonych, otrzymujących kolejny przeszczep, wymagających zastosowania indukcji biologicznej w pierwszych dniach po transplantacji - nadal istnieje przestrzeń i uzasadnienie dla badań nad częstością występowania dnDSA w szczególnych grupach pacjentów niższego ryzyka, nad swoistymi czynnikami ryzyka ich występowania oraz przede wszystkim nad związkami między siłą/zakresem podstawowej, rutynowej immunosupresji, a ryzykiem pojawiania się dnDSA u chorych (w tym zwłaszcza dzieci), uznanych za należących do grup niskiego (lub co najwyżej umiarkowanego) ryzyka immunologicznego. Opisywane protokoły immunosupresji, dobierane do oszacowanego ryzyka immunologicznego, zawierają zalecenia o dość szerokim zakresie dopuszczalnego stężenia podstawowych leków oraz zalecenia co do kojarzenia leków ze sobą, celem uzyskania efektu synergistycznego w immunosupresji, co jednocześnie ma umożliwiać planowe obniżanie dawek i stężenia wybranych leków, celem obniżenia ich swoistej toksyczności (ang. *minimization protocols*). Niezależnie od ogólnie przyjętych zasad leczenia immunosupresyjnego i powszechnego ich stosowania, część chorych wykazuje dobre odległe rokowanie i długo utrzymuje czynność przeszczepionej nerki, a u pozostałych, mimo stosowania podobnego schematu leków – rozwijają się dnDSA i ujawniają się odległe skutki ich obecności. Ocena przyczyn tych odmierności jest podstawą niniejszej pracy.

Pomimo znacznej poprawy przeżywalności krótkoterminowej przeszczepu nerki zarówno u dorosłych, jak i u dzieci [78], długoterminowa przeżywalność przeszczepu pozostaje poważnym problemem. Przez wiele poprzednich lat postulowano, że główną przyczyną

niewydolności po pierwszym roku od transplantacji pozostaje przewlekła nefropatia (ang. *chronic allograft nephropathy*; CAN) [79,80]. Z histopatologicznego punktu widzenia CAN cechowała głównie obecność przewlekłego włóknienia śródmiąższu i zaniku cewek nerkowych (ang. *interstitial fibrosis/tubular atrophy*; IFTA), natomiast klinicznie wyrażała się systematycznie pogarszającą się funkcją przeszczepu, z obniżaniem przesączania kłębuszkowego, towarzyszącym nadciśnieniem tętniczym oraz białkomoczem. Dochodziło do niej na skutek niekorzystnego wpływu zarówno czynników immunologicznych, jak i nieimmunologicznych. Należały do nich przebyte epizody ostrego odrzucania, wytwarzanie przeciwciał anti-HLA wskutek niezgodności antygenowych pomiędzy dawcą a biorcą i nieadekwatna immunosupresja. Do czynników nieimmunologicznych zaliczano m. in. obciążenia okołoperacyjne tj. uszkodzenie niedokrwienne i opóźnioną czynność przeszczepu, przewlekłą toksyczność inhibitorów kalcyneuryny (głównie cyklosporyny A), infekcje wirusowe, nawrót choroby podstawowej, utrwalone nadciśnienie tętnicze i białkomocz [80]. Należy pamiętać, że dwie dekady temu nie stosowano powszechnie celowanej profilaktyki przeciwwirusowej, ani renoprotekcji farmakologicznej, jak obecnie. Największą rolę w rozwoju CAN przypisywano przewlekłej nefrotoksyczności cyklosporyny A, z wywołaną jej lokalnym działaniem wazokonstrykcją naczyń kłębuszków nerkowych oraz indukcją lokalnej obecności transformującego czynnika wzrostu-beta ($TGF-\beta$) w komórkach kanalików nerkowych, prowadzącej do postępującego włóknienia nerki [81]. Przyjęcie tezy o podstawowym znaczeniu CAN i nefrotoksyczności cyklosporyny jako głównej przyczynie później utraty czynności przeszczepu znacząco ukierunkowała praca Nankivella i wsp. (2003), w której na dużym materiale klinicznym dorosłych biorców przeszczepu wykonano powtarzane przez kilka lat po transplantacji seryjne biopsje protokolarne wykazując, że przewlekłe uszkodzenie histologiczne może być widoczne już po 3 miesiącach oraz występuje niemal u 100% pacjentów 10 lat po przeszczepieniu. Winę głównie przypisano cyklosporynie A [82]. Autorzy randomizowanego badania z 15-letnią obserwacją, w którym albo kontynuowano, albo ją wcześniej odstawiano sugerowali, że inhibitory kalcyneuryny zapewniają początkowo większą korzyść dla czynności przeszczepu (chroniąc przed ostrym odrzucaniem), za to potem, po latach, następuje postępujący spadek funkcji przeszczepu związany z toksycznością leku [83]. W przeszłości większość chorych otrzymywała immunosupresję, której głównym składnikiem była cyklosporyna A, azatiopryna i steroidy. Zamiana cyklosporyny na takrolimus,

wprowadzenie mykofenolan umofetylu w miejsce azatiopryny, szerokie wprowadzenie monitorowania i profilaktyki przeciwwirusowej, wprowadzenie zasad nefroprotekcji oraz wdrożenie nowoczesnych technik doboru tkankowego i monitorowania immunologicznego zmieniło pogląd na znaczenie i hierarchię przyczyn późnej utraty czynności przeszczepu nerki, kierując uwagę klinicystów na humoralną komponentę odpowiedzi immunologicznej [84].

Ważnym odkryciem w ostatniej dekadzie było wykazanie, że obecność przeciwciał przeciwko antygenom dawcy przeszczepu (ang. *donor specific antibodies*; DSA), których efektem jest rozwój przewlekłego humoralnego odrzucania (ang. *chronic antibody mediated rejection*; cAMR), jest odpowiedzialna za duży odsetek długoterminowych niepowodzeń przeszczepu, które wcześniej przypisywano toksyczności cyklosporyny (lub wtórnie - przewlekłej nefropatii przeszczepu) [85, 86, 82]. Pojawienie się bardziej czułych technik wykrywania DSA i identyfikacja produktu degradacji dopełniacza jakim jest obecność C_{4d} w kapilarach okołocewkowych zwiększyło zrozumienie mechanizmów cAMR i przyczyniło się do jego klasyfikacji [87, 88]. Ciągłym wyzwaniem terapeutycznym pozostaje więc stosowanie skutecznej i bezpiecznej immunosupresji oraz unikanie niepożądanego toksyczności leków w celu utrzymania jak najdłuższej funkcji przeszczepionej nerki.

Częstość występowania wczesnego ostrego humoralnego odrzucania, spowodowanego przez istniejące wcześniej przeciwciała anti-HLA, specyficzne dla dawcy, została prawie całkowicie wyeliminowana przez dokładną ocenę immunologiczną przed transplantacją. Podobnie, częstość występowania ostrego odrzucania T- komórkowego została znacznie zmniejszona dzięki stosowaniu coraz skuteczniejszych schematów leczenia immunosupresyjnego. Niemniej, przewlekłe odrzucanie z udziałem przeciwciał (cAMR) odgrywa krytyczną rolę w utracie przeszczepu nerki i jest uważane za jedną z najważniejszych barier ograniczających długoterminowe wyniki. Do wytwarzania DSA mogą przyczynić się różne czynniki ryzyka, takie jak: niezgodność antygenów HLA (w tym zwłaszcza niezgodności w zakresie doboru antygeny DQ), nieadekwatna immunosupresja wynikająca z nadmiernej minimalizacji dawek/stężenia leków, nieprzestrzeganie zaleceń przez pacjentów (ang. *non-adherence*) oraz stan zapalny tkanek przeszczepu wywołany zakażeniami wirusowymi, odrzucaniem komórkowym lub urazem niedokrwiennym powodującym zwiększenie immunogenności narządu [89].

Mechanizm działania dnDSA polegający na wiązaniu się z antygenami obecnymi na komórkach śródbłonna przeszczepu i aktywacja klasycznego szlaku układu dopełniacza jest kluczowym

mechanizmem ostrego odrzucania z udziałem przeciwciał. Kolejnym szlakiem działania przeciwciał DSA uszkadzającym przeszczep nawet przy braku aktywacji dopełniacza, jest cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał. Jednym z elementów rozpoznawania przewlekłego odrzucania humoralnego jest obecność w biopsjach nerki złogów dopełniacza C_{4d} w kapilarach okołocewkowych. Obecność C_{4d} jest związana z cięższą prezentacją kliniczną, podczas gdy C_{4d}-negatywne odrzucanie może być wywołane przez mechanizmy niezależne od dopełniacza, które mają charakter subkliniczny lub przewlekły i prowadzą do późnej dysfunkcji i utraty przeszczepu [90].

W świetle powyższych danych oznaczanie obecności przeciwciał anti-HLA (dnDSA) weszło obecnie do standardu opieki potransplantacyjnej. Niemniej, znaczenie ma wybór sposobu ich monitorowania, wpływający na interpretację wyników badań. Ocena dwóch grup chorych w obecnym badaniu jest tego przykładem. Część retrospektywna i prospektywna tego badania pokazują dwa odmienne problemy kliniczne związane z wytwarzaniem dnDSA oraz całkowicie różną częstość ich występowania w zależności od przyjętego sposobu wyboru czasu wykonywania badań. W części retrospektywnej możliwość wykonania badania w kierunku obecności dnDSA była ograniczona do przypadków uzasadnionych klinicznie, co było wynikiem w przeszłości ograniczonej dostępności badań (i funduszy pokrywających ich koszt) i miało znaczenie diagnostyczne, wspomagające ustalenie przyczyny pogorszenia funkcji nerek (wyrażonej jako wzrost stężenia kreatyniny w surowicy o 30% w stosunku do wartości wyjściowej w dwóch kolejnych oznaczeniach). Przy zastosowaniu tego kryterium (badanie tylko ze wskazań klinicznych) potwierdzona częstość występowania dnDSA w tej grupie wynosiła 100%. Z kolei w prospektywnej części badania, w której wszyscy kolejni pacjenci byli regularnie badani pod kątem obecności dnDSA zgodnie z protokołem, od dnia przeszczepienia do dwóch pierwszych lat po transplantacji, wykazano ogólną niską częstość występowania dnDSA na poziomie 21% (po 2 latach obserwacji) oraz to, że częstość ta regularnie wzrastała wraz z czasem po transplantacji (z wartości 8% po 3 miesiącach, poprzez 11% po 6, 16% po 12 i 21% po 24 miesiącach obserwacji). Ogólna częstość prospektywnego wykrywania dnDSA na poziomie nieco powyżej 20% powtarza się w innych publikacjach, zarówno starszych, jak opublikowanych współcześnie. W pracy Terasaki'ego i wsp. (2007) wykazano, że częstość ta (na przestrzeni 4 lat obserwacji) wynosiła 23.3% [51]. W pracy Gajardo i wsp. (2021) opisującej losy chorych niskiego ryzyka częstość występowania dnDSA po 10 latach obserwacji wynosiła

22,3% [91]. Zależność częstości występowania DSA od stanu klinicznego chorych po transplantacji wykazano m.in. we współczesnej pracy Fichtnera i wsp. (2022), w której u chorych, u których nie wykazano w biopsji nerki cech odrzucania, częstość ta wynosiła 21.1%, natomiast u chorych z potwierdzonym odrzucaniem humoralnym wyniosła 71.4% [52]. Chaudri i wsp. (2013) wykazali częstość występowania dnDSA na poziomie 25% u dzieci po transplantacji nerki, określanych jako pacjenci niskiego ryzyka immunologicznego [92]. Dostępne w publikacjach dane co do ogólnej częstości wykrywania dnDSA są więc zbieżne z uzyskanymi w obecnej pracy (w ocenie grupy prospektywnej). Przeciwciała anty- HLA mogą występować jeszcze przed przeszczepieniem (ang. *preformed DSA*), niemniej to zjawisko jest na ogół związane z uczuleniem immunologicznym spowodowanym poprzednią transplantacją i utratą (poprzedniego) przeszczepu w mechanizmie humoralnego odrzucania. Silnym bodźcem stymulującym nasilenie obecności DSA w krążeniu jest usunięcie niewydolnego przeszczepu. W pracy De Bello i wsp (2012) wykazano, że po usunięciu niewydolnej nerki obecność DSA zarówno klasy I, jak i II systematycznie narasta w odstępach 3 miesięcznych u ponad 40% chorych obserwowanych ponad 1 rok [40]. Przeciwciała pojawiają się także „od nowa” po przeszczepieniu nerki (dnDSA). Znaczenie klasy I i II przeciwciał anty HLA jest różne. Obecność preformowanych DSA klasy I oraz w wariacie *de novo*, wykazuje związek z występowaniem wczesnego ostrego odrzucania przeszczepu (< 3 miesiąca po transplantacji), co w przypadku dużego nasilenia tego procesu i jego humoralnego charakteru może skutkować szybką utratą nerki. Przeciwciała klasy II skierowane są przeciwko antygenom DR, DQ i DP, obecnym na komórkach prezentujących antygeny, które mogą również ulegać wzmożonej ekspresji po urazach pro-zapalnych takich jak uraz niedokrwienno – reperfuzyjny i infekcja. Ich obecność (jako przeciwciał preformowanych) skutkuje dodatnim wynikiem próby krzyżowej z komórkami B (ang. *B-cell positive cross-match*), co nie wyklucza decyzji o przeszczepieniu, choć istotnie zwiększa ryzyko immunologiczne tej procedury. Obecność dnDSA klasy II, które mogą pojawiać się stopniowo, późno (po kilku latach) po transplantacji, koreluje z rozwojem późnego przewlekłego odrzucania (cAMR) i przewlekłej glomerulopatii, stąd mają one wpływ na odległe losy przeszczepu [32]. W większości DSA *de novo* po przeszczepieniu nerki stanowią przeciwciała klasy II, zwłaszcza anty- HLA DQ.

Zatem występowanie konkretnego fenotypu odrzucania z udziałem przeciwciał po przeszczepieniu nerki jest determinowane przez czas, zakres odpowiedzi humoralnej oraz

różne cechy przeciwciał DSA. Te cechy to swoistość dla dawcy, klasa antygenów których dotyczą, siła przeciwciał, przewaga określonej podklasy IgG oraz zdolność wiązania dopełniacza (C_{1q}). Możliwość oceny reakcji wiązania dopełniacza C_{1q} poprawiła zdolność do przewidywania fenotypów odrzucania zależnego od przeciwciał [31]. Przeciwciała specyficzne dla dawcy wiążące C_{1q} są związane są z ostrym odrzucaniem indukowanym przeciwciałami, bardziej nasilonym uszkodzeniem przeszczepu (w ocenie histopatologicznej bardziej rozległe zapalenie, zapalenie mikrokrążenia, *endarteritis*, glomerulopatia przeszczepu oraz złogi C4d) oraz wcześniejszą jego utratą, podczas gdy przeciwciała specyficzne dla dawcy niewiążące C_{1q} korelują z subklinicznym lub przewlekłym odrzucaniem indukowanym przeciwciałami i późną utratą przeszczepu [93]. Patogenność DSA różni się w zależności od profilu podklas immunoglobulin IgG których dotyczą, mają one bowiem różne zdolności do aktywacji dopełniacza i wiązania komórek efektorowych poprzez receptor Fc. Przeciwciała klasy I należą głównie do przeciwciał klasy IgG1 oraz IgG3 a klasy II, IgG2 oraz IgG4. Przeciwciała klasy IgG3 są często związane z ostrym odrzucaniem indukowanym przez przeciwciała i ciężkim uszkodzeniem przeszczepu, podczas gdy przeciwciała klasy IgG4 niewiążące dopełniacza są bardziej skorelowane z subklinicznym lub przewlekłym odrzucaniem i glomerulopatią przeszczepu [94].

Stężenie DSA jest wyrażane jako pośrednia wartość MFI (ang. *mean fluorescence intensity*). Jednak prosta korelacja między „siłą” DSA, a wynikiem klinicznym, nie zawsze jest jednoznaczna. DSA o podobnej wartości MFI nie zawsze aktywują kaskadę dopełniacza, co wiąże się u części pacjentów z brakiem następstw klinicznych w postaci dysfunkcji graftu. Występowanie dnDSA po transplantacji jest obecnie uznawane za narzędzie do identyfikacji pacjentów zagrożonych odrzucaniem z udziałem przeciwciał cAMR i utratą przeszczepu. Nadal nie jest jasne i jest przedmiotem dyskusji, czy odstęp czasu od przeszczepienia do wystąpienia dnDSA ma znaczenie kliniczne (ang. *early vs late onset DSA*) [29,95]. Lee i wsp. (2009) opisali, że pacjenci rozwijający dnDSA < 1 roku po transplantacji prezentowali gorsze wyniki w zakresie 10-letniego przeżycia przeszczepu w porównaniu z pacjentami późno wytwarzającymi dnDSA (27 vs. 80%) [18]. Cioni i wsp. (2017) porównali grupy pacjentów z niskim ryzykiem immunologicznym i porównywalnymi czynnikami ryzyka, z wcześnie wykrytym dnDSA < 1 roku po transplantacji i późnym ujawnieniem się dnDSA > 1 roku, nie stwierdzając istotnej różnicy w zakresie częstości cAMR i częstości utraty przeszczepu w 5-letniej obserwacji (późne cAMR

u 47% pacjentów z grupy wczesnej vs 58% z grupy późnej; utrata przeszczepu odpowiednio 20% vs 17%) [96]. W różnych publikacjach częstość występowanie dnDSA w 1 tym roku po przeszczepieniu nerki jest szacowana na około 2-10% i zwiększa się o 2% rocznie, osiągając około 10-40% w 4-5 roku po przeszczepieniu. Średni czas pojawienia się dnDSA wynosi 3,8-68 miesięcy po transplantacji [97-102]. Tak duży rozrzut oby tych wskaźników (częstości i czasu) pokazuje, że dane na ten temat mogą się istotnie różnić w zależności od przyjętych kryteriów. W obecnym badaniu, wśród pacjentów grupy prospektywnej, w ciągu dwóch lat po transplantacji 21% chorych wytworzyło przeciwciała dnDSA, w tym 25% klasy I, a 75% klasy II. Natomiast w grupie retrospektywnej w której przeciwciała dnDSA były obecne u 100% chorych, klasa I występowała w 28%, klasa II u 52% przypadków, a w 21% przypadków przeciwciała należały do obydwu klas.

Przypisanie znaczenia klinicznego przeciwciałom DSA opiera się na dwóch parametrach: - wartości MFI oraz - zdolności wiązania dopełniacza (C_{1q}). Raportowane dane o klinicznym znaczeniu progów wartości MFI wskazują, że wartości < 5000 mogą być uznawane za nieistotne dla rokowania. W badaniu Steggerdy i wsp. (2017), z udziałem dzieci po transplantacji nerki wykazano, że obecność DSA o MFI w zakresie 2500-5000 nie wiązała się z potwierdzonymi w biopsji epizodami odrzucania przeszczepu, przy zakresie 5000-10000 wykazywano nieliczne epizody ostrego komórkowego odrzucania i dopiero przy wartościach MFI $>10\ 000$ występowały liczne epizody odrzucania humoralnego [25]. W grupie prospektywnej we wszystkich potwierdzonych przypadkach obecności przeciwciał, wartość MFI dnDSA była niższa od 3000. Wartość wskaźnika MFI DSA została wykorzystana do stworzenia kalkulatora ryzyka (DSA-RIS; *DSA-Representative Scoring System*) oceniającego prawdopodobieństwo wystąpienia humoralnego odrzucania u dzieci po transplantacji nerki, w którym wartości MFI w zakresie „słabym” (weak) czyli 2500-5000, „umiarkowanym” (5000-10000) i „silnym” (>10000) poszczególnych wykrytych DSA (skierowanych przeciwko różnym antygenom HLA) u jednego pacjenta są przeliczane na punkty (2 punkty za „słabe”, 5 za „umiarkowane” i 10 za „silne”). Wartością progową, przy której przewidywane ryzyko wystąpienia AMR przekraczało 90%, było ≥ 17 , niemniej wskazany trend (im wyższa jest suma punktów, wyrażona jedną liczbą, tym większe jest ryzyko wystąpienia humoralnego odrzucania) jest logiczny dla praktyki klinicznej [26]. W obecnym badaniu mediana wartości tego wskaźnika, wyliczonego u pacjentów dnDSA(+) z grupy prospektywnej wynosiła 2, a u

pacjentów dnDSA(+) należących do grupy retrospektywnej wynosiła 13. Nie porównywano statystycznej istotności tej różnicy ze względu na różne kryterium przynależności do grupy retrospektywnej (wszyscy pacjenci DSA+) i prospektywnej (wszyscy chorzy), niemniej różnica numeryczna tych wartości wskazuje na praktyczną przydatność obliczania takiego wskaźnika dla przewidywania ryzyka humoralnego odrzucania. O ile bowiem w grupie prospektywnej nie obserwowano ani jednego przypadku humoralnego odrzucania, to u 66% chorych z grupy retrospektwnej, u których wykonano biopsję nerki – było ono potwierdzone.

Trzeba podkreślić, że badania poszukujące czułych i „wyprzedzających” markerów ostrego odrzucania wskazały, iż klinicyści powinni zwracać także uwagę na przypadki chorych wykazujących niższe wartości MFI dnDSA rzędu 2500, bowiem już przy tej wartości pojawia się wyższe stężenie Dd-CfDNA, czyli fragmentów DNA dawcy przeszczepu, korelujące z procesem późnego humoralnego odrzucania [27]. Wynika z tego, że wykrycie dnDSA nawet o niskim MFI jest wskazaniem do regularnego monitorowania dynamiki potencjalnego wzrostu zarówno ich częstości, jak i wartości (MFI) u tego samego pacjenta i to z większą częstością, niż „tradycyjne” jeden raz w roku w późniejszych latach po transplantacji.

Drugim parametrem wyróżniającym kliniczne znaczenie DSA jest zdolność wiązania dopełniacza. Jest ona typowa dla przeciwciał klasy I. Yell i wsp. (2015) wykazali istotną korelację między cechą C_{1q+} DSA i występowaniem potwierdzonego w biopsji nerki humoralnego odrzucania, niemniej istotne znaczenie tej cechy (C_{1q+}) pojawiało się dopiero wtedy, kiedy wartość MFI przekraczała 7000 [31]. Sigurjonsdottir i wsp. (2022) badając 233 dzieci po transplantacji nerki wykazali, że utrwalona (mimo prób swoistego leczenia) obecność DSA C_{1q+} korelowała z utratą przeszczepu, przy czym mediana MFI wynosiła 15357, co potwierdza poprzednią informację o dodatkowym znaczeniu wartości MFI [105]. W obecnym badaniu, u chorych z grupy prospektywnej, tylko w jednym przypadku przeciwciała wiązały składową dopełniacza C_{1q} (dnDSA C_{1q+}), a w pozostałych nie wykazywały tej cechy. W świetle tych informacji, status ryzyka pacjentów należących do grupy prospektywnej u których dane na temat MFI i C_{1q} było dostępne należy uznać za niski. W grupie tej potwierdzono biopsją nerki 7 przypadków (18%) ostrego odrzucania, niemniej w żadnym przypadku proces ten nie miał komponenty humoralnej. Niemniej, jednocześnie wykazano, że sama obecność dnDSA była związana z 4.5 - krotnym ryzykiem obniżenia przesączania kłębuszkowego o $\geq 30\%$ w czasie 2 -letniej obserwacji. Jedną z możliwych przyczyn tego zjawiska może być występowanie

subklinicznego przewlekłego humoralnego odrzucania, gdzie na wczesnym etapie lokalnego stanu zapalnego wewnątrz miąższu nerki, wykrywanego głównie w biopsjach protokolarnych, nie występują na tyle wyraźne objawy dysfunkcji przeszczepu, by skłonić klinicystę do wykonania biopsji (ze wskazań klinicznych) [106, 107]. Stąd nie można wykluczyć, że gdyby w tej grupie wykonywać regularnie biopsje protokolarne, potencjalnie można by zidentyfikować niejawnie przypadki wczesnej fazy cAMR. Zagadnienie realnej przydatności biopsji protokolarnych po transplantacji nerki jest przedmiotem kontrowersji [108]. Wątpliwości te są jeszcze bardziej nasilone u dzieci, zwłaszcza młodszych, w kontekście konieczności wykonywania za każdym razem znieczulenia ogólnego celem bezpiecznego wykonania biopsji oraz niejasności, czy wykrycie niewielkich zmian typu „borderline” ma skłaniać do nasilenia immunosupresji. Zotta i wsp. (2018) wykonywali u dzieci biopsje protokolarne po 3, 6 i 12 miesiącach oraz po 5 latach od transplantacji nerki. Wykonano 155 biopsji do 3 miesiąca, 125 po roku i 55 po 5 latach. Jak wykazano, wynik mniej niż 1/5 ogólnej liczby biopsji wykonanych do pierwszego roku po transplantacji wpłynął na modyfikację postępowania, natomiast wynik żadnej z biopsji późniejszych go nie zmienił. W przeważającej części wczesnych biopsji obraz nerki był prawidłowy (66.4%) oraz stwierdzano zmiany graniczne (ang. borderline) (9%). Wykryto 1 przypadek (0.8%) AMR (w biopsji po 1 roku). Dodatkowo, kiedy porównano dynamikę eGFR u chorych, u których w oparciu o wynik biopsji protokolarnych zmodyfikowano/lub nie zmodyfikowano immunosupresję, nie wykazano istotnych różnic [109]. W sumie, badanie to nie potwierdziło klinicznej przydatności wykonywania biopsji protokolarnych u dzieci po transplantacji nerki. Z ekstrapolacji danych opublikowanych przez Rush'a (2007) i (2019), oceniających przydatność kliniczną wczesnych biopsji protokolarnych u chorych dorosłych otrzymujących w immunosupresji takrolimus i MMF wynika, że trzeba wykonać taką biopsję u > 10 pacjentów, aby wychwycić 1 przypadek subklinicznego ostrego odrzucania [106, 110].

W praktyce Centrum Zdrowia Dziecka biopsje przeszczepionej nerki wykonywane są tylko ze wskazań klinicznych, choć raportowana przez innych, potencjalna (ale rzadko występująca), korzyść kliniczna z biopsji protokolarnych wykonywanych w wybranych, pojedynczych przypadkach może być postrzegana jako tzw. wartość dodana do innych sposobów monitorowania chorych.

Innym z możliwych hipotetycznych wyjaśnień znaczenia obecności dnDSA dla pogorszenia filtracji kłębuszkowej, mimo nieobecności jawnych objawów cAMR, może być opisana przez Fichtnera i wsp. (2021) wysoka częstość współistnienia u tych samych chorych przeciwciał anty-HLA (dnDSA) oraz przeciwciał non-HLA, takich jak przeciwciała przeciwko receptorowi typu 1 dla angiotensyny II (AT₁R-Ab) lub receptorowi typu A dla endoteliny-1 (ET_A R-Ab) [52]. Obecność tych przeciwciał jest obciążająca dla czynności przeszczepu, bowiem wywołują lokalny stan zapalny mediowany przez m.in. IL-18, której stężenie jest u takich chorych podwyższone. Jak wykazano w pracy Fichtnera, obecność takich przeciwciał koreluje z odległym obniżeniem przesączania kłębuszkowego o >30%, mimo że nie rozwijają oni klasycznego, szybko postępującego cAMR, typowego dla obecności dnDSA o wysokim MFI. U ok. połowy takich chorych mimo obecności przeciwciał non-HLA i przy pogorszeniu eGFR (>30%) nie wykazywano w biopsji nerki cech odrzucania [52]. Podobna obserwacja została opublikowana przez Pizzo i wsp. (2022), gdzie wykazano niekorzystny wpływ wykrywanych już przed transplantacją przeciwciał non-HLA (anty-AT1R ab.) na czynność przeszczepu, nie zawsze przekładającą się na ostre odrzucanie [111]. Wykazywano także znaczące zróżnicowanie destrukcyjnej siły sprawczej takich przeciwciał, opisując (obok przypadków znaczącego uszkodzenia przeszczepu) obecność tych przeciwciał (uznawanych wówczas za autoprzeciwciała) u zdrowych ludzi [112]. Przy obecnym stanie wiedzy monitorowanie przeciwciał non-HLA powinno być rutynowo wykonywane, o ile nieprospektywnie, to co najmniej u chorych z niewyjaśnionym inaczej, postępującym pogorszeniem czynności przeszczepionej nerki [113]. W obecnej pracy nie badano chorych w kierunku przeciwciał non-HLA, stąd powyższe hipotetyczne wyjaśnienie nie może być potwierdzone własnymi danymi. Niemniej obniżenie czynności przeszczepu w materiale własnym (w grupie prospektywnej, dnDSA+) miało miejsce przede wszystkim w drugim roku obserwacji, kiedy narastała częstość występowania dnDSA, co może sugerować równoległe pojawianie się przeciwciał non-HLA.

U 66% chorych z grupy retrospektywnej (gdzie obecność dnDSA potwierdzono w 100% przypadków) w biopsji wykonanej ze wskazań klinicznych przy zastosowaniu kryteriów Banff, rozpoznano przewlekłe humoralne odrzucenie (cAMR). W 2 innych przypadkach (8%) w biopsji występowała przewlekła glomerulopatia, ale mimo obecności dnDSA w surowicy obraz patomorfologiczny nerki nie spełniał dodatkowych kryteriów Banff [13,14]. W dalszej obserwacji 41% chorych z tej grupy utraciło czynność przeszczepu w czasie kolejnych 2 lat.

Potwierdza to istotne znaczenie rozpoznania cAMR (przy obecności dnDSA) dla rokowania po transplantacji nerki. W obszernej pracy Wiebe i wsp. (2017) obejmującej 596 analizowanych chorych dorosłych, odsetek późnej utraty przeszczepu u chorych dnDSA(+) z potwierdzonym w biopsji aktywnym cAMR wynosił aż 92% (a sama tylko obecność dnDSA podwyższała to ryzyko 3-krotnie) [56].

Niezależnie od istotnych czynników ryzyka immunologicznego, wpływających na częstość występowania DSA, takich jak nieoptymalny dobór HLA, retransplantacja i (stymulujące powstawanie przeciwciał) ostre odrzucanie przeszczepu, podstawowe znaczenie ma wybór immunosupresji, jej nasilenie, typ metabolizmu podstawowych leków oraz jakość przestrzegania zaleceń co do starannego i regularnego jej stosowania przez pacjenta. Immunosupresja jest wstępnie dobierana do oszacowanego przed transplantacją zakresu ryzyka immunologicznego. U chorych wysokiego ryzyka immunologicznego, obok immunosupresji podtrzymującej (ang. *maintenance immunosuppression*) dodatkowo stosuje się indukcję opartą o podawanie leków biologicznych: - blokującą (obecnie z zastosowaniem bazyliksymabu) lub - deplecyjną (z zastosowaniem tymoglobuliny lub podobnych przeciwciał poliklonalnych) [114, 115]. Indukcja ma za zadanie wzmocnienie immunosupresji podstawowej, co jest osiągnięte albo poprzez blokowanie łańcucha α receptora CD25 dla IL-2, obecnego na limfocytach T, skutkujące hamowaniem aktywacji tych komórek mediowaną przez IL-2 (przeciwciało monoklonalne; bazyliksymab), albo poprzez wiązanie wielu różnych receptorów obecnych na limfocytach T i B, monocytach i makrofagach, skutkujące lizą tych komórek i ich deplecją, czyli utrwalonym w czasie usunięciem ich z krążenia (przeciwciało poliklonalne; tymoglobulina lub podobne) [116]. Efekt działania biologicznej indukcji na docelowe komórki jest ograniczony w czasie. Wykazano, że działanie monoklonalnego przeciwciała blokującego – bazyliksymabu, utrzymuje się przez ok. 2 miesiące od podania 2 dawek, [117] natomiast efekt działania farmakodynamicznego tymoglobuliny jest dłuższy i w zależności od wysokości dawki skumulowanej sięga 6 - 12 miesięcy [118]. Tak, czy inaczej, stosowanie tych leków u chorych wysokiego ryzyka stanowi dodatkową ochronę w czasie, kiedy najczęściej pojawiają się epizody ostrego odrzucania, które mogą być bodźcem do uruchomienia późniejszej odpowiedzi humoralnej. W większości przypadków u chorych niskiego/średniego ryzyka stosuje się obecnie (to jest na przestrzeni ostatnich dwóch dekad) trójlekową immunosupresję, na którą składa się takrolimus, mykofenolan mofetylu i

prednizon, bez indukcji. Podstawą tej decyzji były wyniki dwóch niezależnych randomizowanych badań u dzieci po transplantacji nerki, w których nie wykazano korzyści klinicznych związanych z dodawaniem bazyliksymabu u chorych niskiego/średniego ryzyka immunologicznego [119, 120]. Od ponad dekady u chorych niskiego ryzyka bazyliksymab jest stosowany głównie w przypadkach kwalifikowanych do wczesnego wycofania steroidów, gdzie dodawana jest indukcja blokująca celem wzmocnienia immunosupresji w czasie usunięcia prednizonu po 5 dniach od transplantacji [121,122]. Skład podstawowej trójlekowej immunosupresji, stosowanej u dzieci po transplantacji nerki (bez towarzyszącej indukcji) ewoluował w czasie i przy pojawianiu się (i zatwierdzeniu do stosowania) nowszych leków. I tak z czasem, w zdecydowanej większości przypadków mykofenolan mofetylu zastąpił azatioprynę, a takrolimus cyklosporynę [123]. Dawki i stężenia poszczególnych leków stosowanych u dzieci i młodzieży są opisane w zasadach immunosupresji, jakie obowiązują w poszczególnych ośrodkach, w tym m.in. w Centrum Zdrowia Dziecka [124]. W analizowanym w obecnej pracy materiale klinicznym ryzyko immunologiczne (u pacjentów obydwu grup) oceniano na niskie lub średnie. Podstawą tej oceny był rozkład antygenów HLA. Obecność ponad 3 z 6 niezgodnych antygenów HLA (czyli kryterium średniego ryzyka immunologicznego) w obydwu grupach była porównywalna: wynosiła 60% w grupie prospektywnej i 58% w grupie retrospektywnej. Sumaryczne niezgodności wszystkich antygenów HLA A + B + DR nie różniły się istotnie statystycznie. Nie stosowano w immunosupresji indukcji lekami biologicznymi, a jedynie podstawowe leki w schemacie trójlekowym. Zdecydowana większość chorych otrzymywała kombinację takrolimusu (TAC) (82% w grupie prospektywnej vs. 86% w grupie retrospektywnej), mykofenolanu mofetylu (MMF) (97% w grupie prospektywnej vs 86% w grupie retrospektywnej), oraz prednisonu (Pred) (100% w obu grupach), a podawanie innych leków było krótkotrwałe, bowiem używano ich do konwersji tylko przy działaniach niepożądanych lub nieskuteczności leków podstawowych. Nie wykazano istotnych różnic w rozkładzie podstawowych leków, to jest takrolimusu i mykofenolanu mofetylu (MMF), stosowanych przez większość czasu obserwacji w obu grupach. Mimo wieloletniego doświadczenia ze stosowaniem takich protokołów, wobec faktu, że przy podobnych zakresach dawek i stężenia leków jedni chorzy, o podobnie ocenionym na wstępie profilu ryzyka, niemal nigdy nie rozwijają ostrego, ani przewlekłego odrzucania, a u innych procesy te są częste i skracają przeżycie przeszczepu – nadal nie jest jednoznacznie potwierdzone, jakie są uniwersalnie optymalne zakresy stężenia/dawkowania podstawowych leków w

poszczególnych przedziałach czasu po transplantacji. Niewątpliwie należy je dobierać indywidualnie do przypadku, ale ustalenie optymalnych wartości progowych zakresu stężenia jest nadal przedmiotem badań. Wąskie okno terapeutyczne inhibitorów kalcyneuryny jest efektem niewielkiej różnicy między stężeniem skutecznym i toksycznym. Jednym z powodów dążenia do minimalizacji dawek/stężeń była obawa przed odległą nefrotoksycznością tych leków, uznawaną ponad dekadę temu za podstawową przyczynę późnej utraty czynności nerki [82, 125]. Jak zawsze w transplantologii, wszelkie decyzje terapeutyczne są obosieczne i korzyść z obniżenia ryzyka toksyczności może być przeważona zwiększonym ryzykiem nieskuteczności leków. Z opublikowanych danych wynika, że jednym z podstawowych i ważnych czynników, jakie mogą zahamować powstawanie DSA jest odpowiednie stężenie takrolimusu (TAC). Zakres tego stężenia, opisany w zaleceniach stosowanych w Centrum Zdrowia Dziecka wynosi między 5 i 12 ng/ml między drugim i 6 miesiącem po transplantacji i między 5 i 10 ng/ml powyżej 6 miesiąca, co jednak pozostawia spory margines wyboru dla klinicysty [3]. Logiczne wydawałoby się, że im niższe jest oszacowane ryzyko immunologiczne, tym niższe będą dopuszczalne wartości dolnego zakresu stężenia TAC. Jednym z dowodów na taką zależność jest wynik japońskiego badania (u chorych dorosłych), w którym badaną grupę stanowili biorcy przeszczepu nerki pobranego od żywego spokrewnionego dawcy (Hiramitsu i wsp. 2021), a podstawowym punktem końcowym oceny skuteczności dawkowania takrolimusu była obecność dnDSA. Wykazano, że mediana stężenia TAC C₀ u chorych, którzy wytworzyli przeciwciała anti-HLA wynosiła 3.69 ng/ml, w porównaniu do wartości 4.88 ng/ml u chorych dnDSA (-) [54]. Tak więc w tym badaniu mediana skutecznej wartości TAC C₀ była niższa od 5 ng/ml, co nie jest zalecane w lokalnym protokole Centrum Zdrowia Dziecka, nawet u chorych otrzymujących przeszczep od żywego dawcy. W innym badaniu (także u chorych dorosłych o niskim ryzyku immunologicznym) z randomizacją co do docelowego stężeniu leku, wykazano, że bezpiecznym progiem wartości TAC C₀ „chroniącym” przed wytworzeniem dnDSA było 7 ng/ml. Żaden chory w tym badaniu, utrzymujący trwale TAC C₀ > 7 mg/ml nie wytworzył przeciwciał [55]. Wyniki obecnego badania również wskazały na istotną zależność między stężeniem TAC C₀, a skłonnością do wytwarzania dnDSA. Dotyczyło to chorych z grupy prospektywnej, ale także chorych ocenionych bez względu na przynależność do grupy (prospektywnej/ retrospektywnej), natomiast podzielonych (dla celów analizy) tylko pod względem obecności/nieobecności dsDSA. Po to, by jak najbardziej uwiarygodnić tę analizę, użyto do niej wszystkich dostępnych wyników stężenia TAC C₀ oznaczonych powyżej

pierwszego miesiąca po transplantacji u chorych z grupy prospektywnej (n=181) oraz wszystkich dostępnych wyników stężenia TAC C₀ oznaczonych w czasie dwóch lat obserwacji poprzedzających wykrycie dnDSA w grupie retrospektywnej (n=145). Wykazano, że w obrębie grupy prospektywnej, mediana TAC C₀ u chorych dnDSA (-) była istotnie wyższa (7.9 ng/ml) w porównaniu do chorych dnDSA (+) (7.1 ng/ml; p=0.0088). Wykazano także, że wartość mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) w oznaczeniach pomiędzy 3. a 24. miesiącem po transplantacji w grupie prospektywnej i w oznaczeniach w czasie dwóch lat poprzedzających wytworzenie dnDSA u pacjentów grupy retrospektywnej była istotnie wyższa w grupie prospektywnej i wynosiła 7.3 vs 5.6 (p<0.0001). Przy porównaniu chorych dnDSA (-) i dnDSA (+) w całej populacji także wykazano istotną różnicę wartości TAC C₀ i wyższą wartość mediany u chorych niewytwarzających tych przeciwciał (odpowiednio 7.4 vs 6.0 ng/ml; p<0.0001). Wynika stąd konkluzja, że w ramach dopuszczalnego zaleceniami zakresu terapeutycznego TAC C₀ (tj. 5-10 ng/ml > 6 miesiąca po transplantacji), po to, by zniwelować ryzyko pojawienia się dnDSA, należy utrzymywać te stężenia w górnym trzecim kwartylu tego zakresu, czyli w okolicach 7.5-8 ng/ml, a nie niżej. Oczywista jest konieczność monitorowania potencjalnych działań niepożądanych TAC i ewentualna korekcja dawki/stężenia w odpowiednich przypadkach.

Analizy takie, z poszukiwaniem progu stężenia TAC C₀ chroniącego przed rozwojem dnDSA prowadzono dotąd głównie w populacjach chorych dorosłych, stosując różne formy takiej oceny. Béland i wsp. (2017) porównywali stężenie TAC C₀ u chorych dorosłych, ocenianych prospektywnie pod względem obecności dnDSA, w czasie 1, 2, 6, 12 miesięcy po transplantacji nerki i następnie co 1 rok do końca obserwacji (i analizy). Oceniano stężenie TAC C₀ w dniu oznaczania dnDSA. Wykazano, że progami stężenia TAC C₀ przy którym nie wykryto dnDSA, albo potwierdzona obecność dnDSA nie spowodowała utraty przeszczepu (w dalszej obserwacji) było 6.3 ng/ml. Im niższe było stężenie TAC C₀ (w zakresie 5.3-6.3 oraz < 5.3 ng/ml), tym istotnie częściej pacjenci dnDSA(+) tracili przeszczep nerki w ciągu następnych 3 lat [57]. Podobny trend wykazano w obecnej pracy, bowiem 41% pacjentów z grupy retrospektywnej, gdzie mediana TAC w oznaczeniach w czasie dwóch lat poprzedzających wytworzenie dnDSA wynosiła 5.6 ng/ml, utraciło przeszczep w czasie 2,4 roku po zakończeniu obserwacji. Agur i wsp. (2022) poddali retrospektywnej ocenie znaczenie wielkości TAC C₀ dla ryzyka utraty przeszczepu nerki (w mechanizmie immunologicznym) u chorych dorosłych w jeszcze inny sposób. Podzielili zakres uzyskiwanych wartości stężenia TAC C₀ w ciągu pierwszego roku po

transplantacji na przedziały: 3-4; 4.01-5; 5.01-6; 6.01-7 i 7.01-8.0 ng/ml oraz poddali ocenie długość czasu (w dniach) pozostawiania TAC C₀ w każdym z tych przedziałów wartości. Z tych danych wynika, że pozostawianie TAC C₀ < 6 ng/ml w czasie > 14 dni stanowi istotny czynnik późnej utraty przeszczepu nerki [53]. Davis i wsp. (2020) wykazali podobną zależność, choć przy innych wartościach progowych. Opisali oni, że istotnym czynnikiem rozwoju dnDSA był odsetek długości czasu pozostawiania stężenia TAC C₀ poniżej dolnego progu zalecanych w danym okresie po transplantacji wartości (w tym przypadku < 8 ng/mL). O ile tak było przez więcej niż ok 40 % czasu obserwacji – to ryzyko wytworzenia dnDSA było istotnie wyższe [62]. Wiebe i wsp. (2017) oceniali wartość progowego TAC C₀ u chorych (dorosłych) niskiego ryzyka immunologicznego, którzy wytworzyli dnDSA (badanie było prospektywne, z oznaczeniami dnDSA w punkcie 0 oraz po 1, 2, 3, 12, 18 i 24 miesiącach od transplantacji), wykazując, że średnie wartości stężenia leku w czasie powyżej 6 miesiąca po transplantacji zawsze były istotnie wyższe u chorych dnDSA (-) i sięgały 7 ng/ml. Dodatkowo wykazano, że wśród chorych o wyższym zakresie niedoboru (epletów) HLA, ryzyko rozwoju dnDSA wzrastało istotnie co każde 0,7 ng/ml TAC C₀ wartości poniżej zakresu zalecanego w danym okresie po transplantacji. Pacjenci w tym badaniu, którzy wytworzyli dnDSA, istotnie częściej wykazywali stężenie TAC C₀ < 5 ng/ml w porównaniu z chorymi, którzy nigdy nie wytworzyli dnDSA oraz pacjenci dnDSA(+) wykazywali istotnie niższe stężenie leku w czasie 6 miesięcy poprzedzających wykrycie dnDSA [56].

Według różnych opublikowanych raportów, jednym z parametrów sprzyjających powstawaniu dnDSA jest istotna zmienność stężenia takrolimusu we krwi w kolejnych oznaczeniach u tego samego pacjenta, co m.in. miałyby być także pośrednim dowodem na nieprzestrzeganie zaleceń co do regularnego przyjmowania leków immunosupresyjnych (ang. *non-adherence*) [126]. Oczywiście, przed interpretacją wartości tego wskaźnika należy wykluczyć inne medyczne przyczyny takiej zmienności, jak okresowe stosowanie innych leków, zmieniających szybkość metabolizmu TAC w szlaku cytochromu P450 lub biegunkę rotawirusową [127 -131]. Innym jeszcze tłem występowania wysokiej zmienności stężenia leku jest określony genotyp cytochromu p450 (CYP3A5) [132]. Na ogół za punkt odcięcia przyjmuje się wartość tego wskaźnika 30%. Zjawisko to występuje zarówno wśród młodych osób dorosłych, jak i niepełnoletniej młodzieży. W pracy Wiebe i wsp. (2017) (pacjenci w wieku dorosłym) wykazano, że wskaźnik zmienności stężenia TAC C₀ był istotnie wyższy u chorych dnDSA(+)

(odpowiednio 39.6 ± 13.5 vs 33.7 ± 13.3 ; $p=0.001$). Wobec uznania przez autorów tego parametru za dowód na *non-adherence*, wykorzystano to pojęcie do analizy wieloczynnikowej ryzyka rozwoju dnDSA wykazując jego istotne znaczenie (ponad 4- krotne zwiększenie ryzyka, $p<0.001$) [56]. W pracy Rodrigo i wsp. (2016) wykazano, że przekroczenie progu 30% wartości wskaźnika zmienności TAC C_0 ponad 2.5 -krotnie zwiększa ryzyko rozwoju dnDSA [61]. Dane opisujące znaczenie zmienności stężenia takrolimusu pochodzą także z ośrodków transplantologii dziecięcej. Piburn i wsp. (2022) oceniali korelację występowania zmienności TAC C_0 dla ryzyka wytwarzania dnDSA u dzieci i młodocianych (średnia wieku 13 lat), wykazując istotną różnicę w jego wartości (wyższą wartość u chorych dnDSA (+): 38% vs 25%; $p<0.0001$). Najwyższa wartość wskaźnika (>41%) korelowała z wytwarzaniem dnDSA C_{1q} (+) [133]. Solomon i wsp. (2020) wykazali, że każdy wzrost wartości wskaźnika zmienności TAC C_0 o kolejne 10%, zwiększało ryzyko wytworzenia dnDSA o 53% ($p=0.048$). Wykazano także znaczenie wieku chorych, bowiem zwiększenie wieku o każdy 1 rok było w tej obserwacji związane z wzrostem ryzyka rozwoju dnDSA o 31% ($p=0.03$) [59]. Arassi i wsp. (2022) opisali istotność związku zmienności TAC C_0 u dzieci i młodzieży i występowania dnDSA, zarówno przy zastosowaniu punktu odcięcia 25% i 30%. Najwyższe wartości wskaźnika nasilały ryzyko rozwoju dnDSA 3.5-krotnie [60].

W obecnym badaniu analiza związku wartości wskaźnika zmienności stężenia C_0 TAC z obecnością/nieobecnością dnDSA w grupie prospektywnej oparta była na ocenie wartości wszystkich oznaczeń C_0 TAC ze wszystkich dostępnych badań wykonywanych między pierwszym a 24 miesiącem po transplantacji. Analiza wartości współczynnika zmienności TAC C_0 nie wykazała istotnej różnicy w jego zakresie między pacjentami dnDSA (-) i dnDSA (+) grupy prospektywnej (31 vs. 29; $p = 0,56$). Wartości wskaźnika jakie obserwowano były zbliżone do „tradycyjnego” progu odcięcia, czyli 30%, niemniej brak różnicy między chorymi dnDSA (+) i dnDSA(-) nie pozwala w obecnym badaniu na przyjęcie tego wskaźnika, jako przyczyny powstawania przeciwciał. Porównano także wartość współczynnika zmienności stężenia leku w okresie dwuletniej obserwacji w grupie retrospektywnej, wykazując, że wartość ta, oceniana w okresie dwóch lat poprzedzających wytworzenie dnDSA była numeratycznie wyższa w porównaniu do grupy prospektywnej (30 vs 23%), ale pozostawała tylko na granicy istotności statystycznej ($p=0.056$). Można przypuszczać, że nieobecność takiego wpływu zmienności stężenia leku w badanej populacji wynika z wieku pacjentów, w większości nie wchodzących

jeszcze w typowy wiek ryzyka non-adherence, to jest powyżej 14-15 roku życia (mediana wieku, odpowiednio: 11.4 i 8.1 lat).

Dostępne są inne dane, negujące bezpośredni efekt zmienności stężenia C₀ TAC w czasie 3-letniej obserwacji na rozwój przewlekłego humoralnego odrzucania. Sablik i wsp (2018) objęli retrospektywnym badaniem 59 dorosłych chorych z potwierdzonym przewlekłym humoralnym odrzucaniem (cAMR) i 189 chorych bez cAMR, nie wykazując między nimi różnicy w zakresie wartości wskaźnika zmienności TAC C₀. Co prawda, obie te wartości (po uśrednieniu) były dość niskie (24.4% vs 23.6%; p=0.47), niemniej w odrębnej analizie wykazano, że im wyższy był wskaźnik zmienności, tym rokowanie (w grupie cAMR) – gorsze [63]. Dotychczasowa dyskusja skupiała się wokół rozważań nad związkami między stężeniem i zmiennością stężenia takrolimusu i występowaniem dnDSA po transplantacji. Jest to uzasadnione mechanizmami działania takrolimusu, swoistymi dla hamowania produkcji przeciwciał anti-HLA. Powstawanie limfocytów B produkujących przeciwciała jest stymulowane T-zależną prezentacją antygenów. Pomocnicze limfocyty T (ang. *follicular T helper*; Tfh) są m.in. zaangażowane w transformację naiwnych komórek B do wysoko swoistych komórek pamięci (B) oraz do komórek plazmatycznych bezpośrednio produkujących przeciwciała [134]. Takrolimus blokuje kalcyneurynę, wskutek czego w kilkuetapowym mechanizmie hamuje transkrypcję interleukiny-2 (IL-2) oraz powstawanie i proliferację limfocytów T, w tym Tfh, oraz hamuje dojrzewanie i aktywację limfocytów B [135-137].

Złożony mechanizm takrolimusu wydaje się więc uzasadniać rozważanie jego podstawowej roli w zapobieganiu odpowiedzi humoralnej po transplantacji narządowej. Niemniej, trzeba podkreślić, że podstawowa immunosupresja jest trójlekowa, stąd należy brać pod uwagę możliwość skumulowanego wpływu trzech leków (takrolimusu, prekursora kwasu mykofenolowego - MMF i steroidów) na układ immunologiczny, w tym zdolność produkcji DSA. Kwas mykofenolowy (ang. *mycophenolic acid*; MPA), powstający z prekursora – mykofenolanu mofetylu (MMF) także ma zdolność hamowania proliferacji limfocytów B [138-140]. Jedną z analiz oceny wpływu mykofenolanu mofetylu (stosowanego jak składnik trójlekowej immunosupresji) na produkcję przeciwciał anti-HLA po transplantacji nerki wykazała, że u pediatrycznych pacjentów niskiego ryzyka immunologicznego, którzy wytworzyli DSA, średnia dawka MMF była istotnie niższa (371 vs 617 mg/m²/d,; p = 0.035), niż u chorych dnDSA (-), i towarzyszyło temu istotne pogorszenie czynności przeszczepu nerki

[64]. Dane na temat bezpośredniego znaczenia obecności steroidów w trójlekowej immunosupresji dla ryzyka powstawania dnDSA nie są jednoznaczne. W badaniu Hoshino i wsp. (2012) wykazano, że przy stosowaniu najniższych dawek (< 10 mg prednisonu dziennie), częstość wykrywania dnDSA istotnie wzrastała [65]. Relacji między wielkością dawki, czy wręcz samym faktem podawania steroidów, a podwyższonym ryzykiem produkcji DSA przeczą dane z badań ze stosowaniem schematów bezsteroidowych, gdzie przy zachowaniu odpowiedniego reżymu podawania pozostałych leków i trzymywania ich stężenia na wyznaczonym poziomie (w tym takrolimusu) – częstość wykrywania dnDSA była podobna do tej, jaką stwierdza się u chorych stale przyjmujących steroidy (to jest < 25%) [66]. W badaniu Galault i wsp. (2017), obejmującym dorosłych chorych niskiego ryzyka immunologicznego, u których odstawiano steroidy, ich nieobecność nie zwiększała częstości występowania dnDSA pod warunkiem, że stężenie TAC C₀ przekraczało 7 ng/ml [55]. Chaudri i w sp. (2013) w randomizowanym badaniu porównującym efekt eliminacji steroidów w potransplantacyjnej immunosupresji u dzieci, wykazali podobną częstość występowania dnDSA (25%) niezależnie od stosowania/wycofania steroidów [92].

Jak dotąd nie opublikowano wyników prób odniesienia skumulowanej siły kilkulekowej immunosupresji do skuteczności zapobiegania powstawaniu przeciwciał anty-HLA. Wyrażenie takiej siły (skuteczności) jednym parametrem nie jest oczywiste, wobec faktu, że o ile rutynowo oznaczane jest stężenie inhibitorów kalcyneuryny, oraz (nie rutynowo)- kwasu mykofenolowego, o tyle nie oznacza się stężenia metabolitów prednisonu, wreszcie stężenia leków są stosowane do monitorowania siły działania konkretnego preparatu, a kojarzenie leków ma pozwalać na planowe obniżanie dawek (i stężenia) dla zmniejszenia toksyczności terapii. Niemniej stworzono taki wskaźnik - skojarzonej siły kilkulekowej immunosupresji, wyrażający jej działanie (wyliczone z wielkości dawek) jedną liczbą. Pierwotnie został on opisany przez Vasudeva i wsp. (2005) i służył próbom analizy korelacji między siłą immunosupresji, a ryzykiem zakażenia Polyoma BKV i wtórnie rozwoju swoistej nefropatii o tej etiologii (BKVN) [67]. Wiadomo, że podstawowym zaleceniem terapeutycznym w przebiegu BKVN jest planowe ograniczenie siły immunosupresji, stąd powstała potrzeba opracowania tego wskaźnika [141]. Wskaźnik został pierwotnie opracowany i użyty do analiz u chorych dorosłych, ale później był zmodyfikowany dla potrzeb pediatrycznych, poprzez odniesienie poszczególnych wartości do wielkości powierzchni ciała. Jego końcowa wartość

(suma siły działania poszczególnych leków) jest wyrażona jedną liczbą [68]. W obecnym badaniu pierwotnie porównano wartości wskaźnika skumulowanej siły immunosupresji wg (Vasudeva) w grupie retrospektywnej, w okresie poprzedzającym wykrycie dnDSA. Wykazano, że wartości występujące 2 lata po transplantacji były istotnie wyższe od wartości występujących w momencie wykrycia dnDSA (5.1 vs 4.3 p <0.0001), co logicznie potwierdza stopniowe zmniejszanie się siły skumulowanej immunosupresji wraz z upływem czasu po przeszczepieniu oraz wskazuje, że przekroczenie pewnego „progu minimum” skutkowało powstaniem przeciwciał. Podobnie, w grupie prospektywnej wykazano, że wartości wskaźnika Vasudeva po upływie 1 roku od transplantacji były istotnie wyższe, niż po 2 latach (6.2 vs 5.2; p= 0.0004). Porównano także wartość tego wskaźnika u wszystkich chorych DSA (+) (z obu grup) i chorych DSA (-). W grupie chorych dnDSA (-) użyto do analizy wskaźnik Vasudeva wyliczony po roku i dwóch latach od transplantacji, a w grupie pacjentów z dnDSA (+) wyliczony na dwa lata, na 1 rok przed wykryciem dnDSA oraz w momencie wykrycia dnDSA. Ze względu na różny czas obserwacji nie porównywano tych parametrów między grupami. Za to wykazano, że zmienność wskaźnika Vasudeva w grupie pacjentów, którzy nie wytworzyli dnDSA, była mniejsza (10% vs 13%) w grupie pacjentów dnDSA (+), niemniej różnica ta nie była istotna statystycznie. Sugeruje to, że u pacjentów którzy nie wytworzyli przeciwciał, rzadziej dochodziło do zmian dawkowania leków immunosupresyjnych, czyli – oznacza to pośrednio, (choć różnica była tylko numeryczna), że wykazywali się oni bardziej stabilnymi stężeniami/dobrą tolerancją leków. Dane związane z wyliczeniem wskaźnika Vasudeva nie dają się porównać z wynikami innych autorów, bo nie stosowano dotąd tego parametru do oceny pobudzenia immunologicznego (wyrażonego jako produkcja dnDSA), czy do oceny ryzyka utraty przeszczepu nerki. Przybliżona, szacunkowa dolna wartość „progowa” wskaźnika Vasudeva, jaka miałaby zapobiegać powstawaniu dnDSA, wyliczana po upływie co najmniej 2 lat po transplantacji, mieści się prawdopodobnie w przedziale 4.5- 5.5, ale pełna weryfikacja wiarygodności tej zależności wymagałaby wieloletniego badania prospektywnego, z zaangażowaniem znacznie większej liczby grupy chorych, regularnie badanych pod kątem obecności dnDSA.

Ograniczenia niniejszej pracy oraz wynikające z jej wyników wartości praktyczne

Ograniczenia obecnej pracy są następujące:

- niedostępność szczegółowych badań oceniających MFI dnDSA oraz ich zdolność wiązania dopełniacza (C_{1q+}) w grupie retrospektywnej, w której badania wykonywano kilka lat temu (kiedy badania te nie były możliwe),
- relatywnie niewielka liczebność grupy prospektywnej i limitowany do 2 lat czas jej obserwacji, co było efektem (relatywnie) niewielkiej liczby transplantacji nerki u dzieci/rocznie oraz było limitowane wysokością budżetu (grantu wewnętrznego IP-CZD S-150) ukierunkowanego na powtarzane oznaczenia dnDSA (liczba badań limitowana funduszami),
- brak możliwości wykonywania badań w kierunku obecności przeciwciał non-HLA, limitowany także wysokością grantu naukowego,

Do wartości praktycznych należy zaliczyć udokumentowanie trzech ważnych elementów postępowania klinicznego u dzieci po transplantacji nerki:

- wykazanie, że także u chorych niskiego ryzyka immunologicznego konieczne jest regularne, protokolarne monitorowanie obecności przeciwciał anty-HLA (dnDSA), bowiem pojawiają się one z regularnie zwiększającą się częstością w miarę upływu czasu po transplantacji; ich regularne monitorowanie powinno być w pełni dostępną i refundowaną praktyką kliniczną, a nie tylko przedmiotem badań naukowych
- potwierdzenie, że spośród składowych trójlekowej immunosupresji, najważniejsze znaczenie ochronne przed wytwarzaniem dnDSA ma takrolimus, a nie inne leki
- wykazanie, że u chorych niskiego ryzyka immunologicznego, w tym pacjentów nie wykazujących cech nieprzestrzegania zaleceń (non-adherence), stężenie C₀ takrolimusu w odległym okresie po transplantacji powinno (o ile to tylko możliwe z powodu ograniczeń wynikających z toksyczności leku) pozostawać na poziomie między 7-8 ng/ml, czyli w trzecim kwartylu zakresu zalecanego przez ogólne rekomendacje co do schematów immunosupresji, bowiem takie postępowanie może zapobiegać powstawaniu dnDSA.

Piśmiennictwo

1. Wühl E, van Stralen K, Wanner C et al. Renal replacement therapy for rare Diseases affecting the kidney: an analysis of the ERA-EDTA Registry. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29(S4):1-8.
2. Chua A, Cramer C, Moudgil A, Martz K, Smith J, Blydt-Hansen T, Neu A, Dharnidharka VR; NAPRTCS investigators. Kidney transplant practice patterns and outcome benchmarks over 30 years: The 2018 report of the NAPRTCS. *Pediatr Transplant*. 2019 Dec;23(8):e13597.
3. Grenda R, Kaliciński P. Przeszczepianie narządów jamy brzusznej u dzieci. *Transplantologia kliniczna*. Red. L. Cierpka i M. Durlik, Termedia, Poznań 2022;24:323-332.
4. Chesnaye NC, Schaefer F, Bonthuis M, Holman R, Baiko S, et.al ESPN/ERA-EDTA Registry Committee. Mortality risk disparities in children receiving chronic renal replacement therapy for the treatment of end-stage renal disease across Europe: an ESPN-ERA/EDTA registry analysis. *Lancet*. 2017;389(10084):2128-2137.
5. Smith JM, Martz K, Blydt-Hansen TD. Pediatric kidney transplant practice patterns and outcome benchmarks, 1987-2010: a report of the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies. *Pediatr Transplant*. 2013;17(2):149-57.
6. Laskin BL, Mitsnefes MM, Dahhou M, et al. The mortality risk with graft function has decreased among children receiving a first kidney transplant in the United States. *Kidney Int*. 2015;87(3):575-83.
7. Hwang A, Cho Y, Cicciarelli J; et al. Risk Factors for Short- and Long-term Survival of Primary Cadaveric Renal Allografts in Pediatric Recipients: A UNOS Analysis. *Transplantation* 2005;80(4):466-470.
8. Neu A, Sander A, Borzych-Dużałka D et al. Comorbidities in chronic pediatric peritoneal dialysis patients: a report of the International Peritoneal Dialysis Network. *Perit Dial Bull* 2012;32(4):410-418.
9. Grenda R, Urzykowska A. Zasady immunosupresji po przeszczepieniu nerki u dzieci. *Forum Nefrologiczne* 2011;4(3):246-251.

10. Grenda R. Immunosupresja po transplantacji nerki u dzieci. Zalecenia dotyczące leczenia immunosupresyjnego po przeszczepieniu narządów unaczynionych (Polskie Towarzystwo Transplantacyjne). Red. M. Durlik, R. Danielewicz, wyd. Fundacja Zjednoczeni dla Transplantacji, 2021, Warszawa.
11. Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Cendales L, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Rodriguez ER, Wallace WD, Glotz D; Banff meeting report writing committee. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2012;12(3):563-70.
12. Halloran O, Reeve JP, Pereira AB et al. Antibody mediated rejection, T-cell mediated rejection and the injury-repair response: New insights from Genome Canada studies of kidney transplant biopsies. *Kidney Int* 2014;85(2):258-264.
13. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation.* 2018;102(11):1795-1814.
14. Loupy A, Mengel M, Haas M. Thirty years of the International Banff Classification for Allograft Pathology: the past, present, and future of kidney transplant diagnostics. *KidneyInt.* 2022;101(4):678-691.
15. Agnieszka Perkowski-Ptasińska A, Diagnostyka zmian w nerce przeszczepionej, *Pol J Pathol* 2011;1(S1):111-149.
16. Durlik M. Leczenie odrzucania przeszczepu nerki zależnego od przeciwciał *Forum Nefrologiczne* 2012;5(2):186–193.
17. Sharma A, Jorgensen DR, Mehta RB, et al. The Clinical Impact of Anti-HLA Donor Specific Antibody Detection Through First Year Screening on Stable Kidney Transplant Recipients. *Transpl Int.* 2022;35:10094 (e-pub).
18. Lee PC, Zhu L, Terasaki P, Everly M: HLA-specific antibodies developed in the first year post-transplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss. *Transplantation* 2009;88(4):568-574.
19. Hirai T, Furusawa M, Omoto K et al. Analysis of predictive and preventive factors for de novo DSA in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2014;98(4):443-450.
20. Djamali A, Kaufman D, Ellis T et al. Diagnosis and management of antibody – mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant* 2014;14(2):255-271.

21. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S et al. Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27(2):615-625.
22. Tait BD, Hudson F, Cantwell L, et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology (Carlton).*2009;14(2):247-254.
23. Jayant K, Reccia I, Julie BM, et al. Role of crossmatch testing when Luminex-SAB is negative in renal transplantation. *Pol J Surg.* 2018;90(1):41-46.
24. Colombo M, Haworth S, Poli F et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: Evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytom. B Clin. Cytom.* 2007;72(6):465–471.
25. Steggerda J, Kim I, Haas M et al. Clinical and histopathologic features of antibody-mediated rejection among pediatric renal transplant recipients with preformed vs de novo donor-specific antibodies. *Pediatr Transplant* 2017;21:doi: 10.1111/ptr.13079.(e-pub).
26. Kim I, Choi J, VoA et al. Risk factors for the development of antibody mediated rejection in highly sensitized pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2017; 21:doi: 10.1111/ptr.13042(e-pub).
27. Butiu M, Obrisca B, Sibuleski L et al. Donor derived Cell-free DNA complements de novo class II DSA in detecting late alloimmune injury post kidney transplantation. *Transplant Direct* 2022;8:e1285. (e-pub).
28. Chopra B, Sureshkumar KK. Emerging role of cell-free DNA in kidney transplantation. *World J Exp Med.* 2021;11(5):55-65.
29. Zhang R. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018;13(1):182-192.
30. Malheiro J, Tafulo S, Dias L et al. Determining donor-specific antibody C1q – binding ability improves prediction of antibody-mediated rejection in human leucocyte antigen-incompatible kidney transplantation. *Transplant Int* 2017;30(4):347–359.
31. Yell M, Muth B, Kaufman D et al. C1q binding activity of de-novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody mediated rejection. *Transplantation* 2015;99(6);1151- 1155.
32. Gosset C, Lefaucheur C, Glotz D. New insights in antibody-mediated rejection *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014;23(6):597-604.

33. Filippone E, Farber J. Humoral immune response and allograft function in kidney transplantation. *Am J Kidney Dis* 2015;66(2):337-327.
34. Higgins R, Lowe D, Daga S et al. Pregnancy-induced HLA antibodies respond more vigorously after renal transplantation than antibodies induced by prior transplantation. *Hum Immunol.* 2015;76(8):546-552.
35. Maximo Silva AC, Sanders-Pinheiro H, Leite RF et al. Nonadherence to Immunosuppressive Medications Following Pediatric Kidney Transplantation Within Full Cost Coverage Health System: Prevalence and Correlates. *Exp Clin Transplant.* 2020; 18(5):577-584.
36. Mehta P, Steinberg EA, Kelly SL et al. Medication adherence among adolescent solid-organ transplant recipients: A survey of healthcare providers. *PediatrTransplant.* 2017; 21(7):doi: 10.1111/petr.13018 (e-pub).
37. Shen CL, Wu BS, Lien TJ et al. BK Polyomavirus Nephropathy in Kidney Transplantation: Balancing Rejection and Infection. *Viruses.* 2021;13(3):487.
38. McCaffrey J, Bhute VJ, Shenoy M. CMV, EBV, JCV and BKV infection and outcome following kidney transplantation in children initiated on a corticosteroid-minimisation immunosuppressive regimen. *Pediatr Nephrol.* 2021;36(10):3229-3240.
39. Schutt R, Case J, Kurian SM et al. Safety and Efficacy of a Steroid Avoidance Immunosuppression Regimen in Renal Transplant Patients With De Novo or Preformed Donor-Specific Antibodies: A Single-Center Study. *Transplant Proc.* 2021; 53(3):950-961.
40. Del Bello A, Congy N, Cardeau-Desangeles I et al. Anti-Human Leukocyte Antigen immunization after early allograft nephrectomy. *Transplantation* 2012;93(9):935-941.
41. Shi X, Lv J, Han W et al. What is the impact of human leukocyte antigen mismatching on graft survival and mortality in renal transplantation? A meta-analysis of 23 cohort studies involving 486,608 recipients. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):116.
42. Williams RC, West L, Opelz G. The Risk of Failure With HLA Mismatch and Recipient Age in First Pediatric (<18 years) Kidney Transplants. *Transplant Direct* 2018;4: e365 (e-pub).
43. Trnka P, McTaggart SJ, Francis A. The impact of donor/recipient age difference and HLA mismatch on graft outcome in pediatric kidney transplantation. *Pediatr Transplant.* 2018;22(7):e13265(e-pub).

44. Sypek MP, Hiho S, Cantwell L et al. Human leukocyte antigen eplet mismatches and long-term clinical outcomes in pediatric renal transplantation: A pragmatic, registry-based study. *Pediatr Transplant*. 2020;24(4):e13705(e-pub).
45. Leeaphorn N, Pena JRA, Thamcharoen N, Khankin EV, Pavlakis M, Cardarelli F. HLA-DQ Mismatching and Kidney Transplant Outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(5):763-771.
46. Larkins N, Wong G, Taverniti A, Kim. Epitope matching in kidney transplantation: recent advances and current limitations. *Curr Opin Org Transplant* 2019;24(4):370-377.
47. Ehlayel A, Simms K, Ashoor I. Emerging monitoring technologies in kidney transplantation. *Pediatr Nephrol* 2021;36(10):3077-3087.
48. Răchișan A, Dubois V, Ranchin B et al. Eplet incompatibility in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant* 2020;24:e13721(e-pub).
49. Schinstock CA, Dadhania DM, Everly MJ et al. Factors at de novo donor-specific antibody initial detection associated with allograft loss: a multicenter study. *Transpl Int*. 2019; 32(5):502-515.
50. Dellares J, deFreitas D, Mengel M et al. Understanding the causes of kidney transplantation failure: the dominant role of antibody mediated rejection and non-adherence. *Am J Transplant* 2012;12(2):388-399.
51. Terasaki P, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* 2007;7(2):408-415.
52. Fichtner A, Süsal C, Höcker B et al. Association of non-HLA antibodies against endothelial targets and donor-specific HLA antibodies with antibody - mediated rejection and graft function in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Nephrol* 2021;36(8):2471-2484.
53. Agur T, Rahamimov R, Zingerman B, et al. Exposure to tacrolimus trough levels below 6 ng/ml during the first year is associated with inferior kidney graft survival. *Clin Transplant*. 2022; 8:e14879.(e-pub).
54. Hiramitsu T, Tomosugi T, Futamura K et al. Optimal blood levels of (extended-release) tacrolimus in living donor kidney transplantation to prevent de novo donor-specific antibody production: a retrospective cohort study. *Int Immunopharmacol* 2021; 91:107038.(e-pub).

55. Gatault P, Kamar N, Büchler M et al. Reduction of extended-release tacrolimus dose in low-immunological -risk kidney transplant recipients increases risk of rejection and appearance of donor-specific antibodies: a randomized study. *Am J Transplant* 2017; 17(5):1370-1379.
56. Wiebe C, Rush D, Nevins T et al. Class II eplet mismatch modulates tacrolimus trough levels required to prevent donor- specific antibody development. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(11):3353-3362.
57. Béland M, Lapointe I, Noël R et al. Higher calcineurin inhibitor levels predict better kidney graft survival in patients with de novo donor-specific anti-HLA antibodies: A cohort study. *Transpl Int* 2017;30(5):502–509.
58. Aksoy G, Comak E, Koyun M et al. Tacrolimus Variability: A Cause of Donor-Specific Anti-HLA Antibody Formation in Children. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2019; 44(4):539–548.
59. Solomon S, Colovai A, Del Rio M, Hayde N. Tacrolimus variability is associated with de novo donor-specific antibody development in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol* 2020;35(2):261–270.
60. Arassi MB, Gauche L, Schmidt J et al. Association of intraindividual tacrolimus variability with de novo donor-specific HLA antibody development and allograft rejection in pediatric kidney transplant recipients with low immunological risk. *Pediatr Nephrol* 2022;37(10):2503-2514.
61. Rodrigo E, Segundo D, Fernández-Fresnedo G et al. Within-Patient Variability in Tacrolimus Blood Levels Predicts Kidney Graft Loss and Donor-Specific Antibody Development. *Transplantation* 2016;100(11);2479–2485.
62. Davis S, Gralla J, Klem P et al. Tacrolimus Inpatient Variability, Time in Therapeutic Range, and Risk of De Novo Donor-Specific Antibodies. *Transplantation*. 2020; 104(4):881-887.
63. Sablik KA, Clahsen-van Groningen MC, Hesselink DA et al. Tacrolimus intra-patient variability is not associated with chronic active antibody mediated rejection. *PLoS One* 2018;13(5):e0196552(e-pub).
64. Strommen AM, Moss MC, Goebel J, Bock M. Donor-specific antibodies in a pediatric kidney transplant population-Prevalence and association with antiproliferative drug dosing. *Pediatr Transplant* 2019 Sep;23(6):e13511(e-pub).

65. Hoshino J, Kaneku H, Everly MJ, Greenland S, Terasaki PI. Using donor-specific antibodies to monitor the need for immunosuppression. *Transplantation*. 2012;93(11):1173-1178.
66. Grenda R. Steroid withdrawal in renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2013; 28(11):2107-2112.
67. Vasudev B, Hariharan S, Hussain S et al. BK virus nephritis: Risk factors, timing and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2005;68(4):834–1839.
68. Höcker B, Fickenscher H, Delecluse H-J et al. Epidemiology and morbidity of Epstein-Barr virus infection in pediatric renal transplant recipients: A multicenter, prospective study. *Clin Infect Dis* 2013;56(1):84–92.
69. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA, Furth SL. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(3):629-37.
70. Seger, Christoph PhD; Shipkova, Maria MD; Christians, Uwe MD, PhD; et al. Assuring the Proper Analytical Performance of Measurement Procedures for Immunosuppressive Drug Concentrations in Clinical Practice: Recommendations of the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Immunosuppressive Drug Scientific Committee. *Therapeutic Drug Monitor* 2016; 38(2):170-189.
71. Terasaki PI, Marchiori TH, Strazl TE. Serotyping of human lymphocyte antigens. Conference on Histocompatibility Testing. Washington, DC: Printing and Publishing Office National Academy of Sciences 1964;83–95.
72. W.T. Eadie, D. Drijard, F.E. James, M. Roos, B. Sadoulet: *Statistical Methods in Experimental Physics*. Amsterdam: North-Holland, 1971; 269–271.
73. Zieliński R., *Tablice statystyczne*, PWN, Warszawa 1972.
74. Corder, G.W. & Foreman, D.I. *Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach* (2009).
75. Magezi DA. Linear mixed-effects models for within-participant psychology experiments: an introductory tutorial and free, graphical user interface (LMMgui). *Front Psychol* 2015 ;6:(2).e-pub.
76. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457–481.
77. Wilcoxon F: Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*, 1945;1:80-83.

78. Tejani A, Stablein DM, Donaldson L, et al. Steady improvement in short-term graft survival of pediatric renal transplants: The NAPRTCS experience. *Clin Transplant* 1999;13:95–110.
79. Chapman JR, O’Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(10):3015–26.
80. Jeffery T, Fletcher & Brian J. Nankivell & Stephen I. Alexander. Chronic allograft nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2009;24(8):1465–1471.
81. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Immunosuppressant-induced nephropathy: pathophysiology, incidence and management. *Drug Saf* 1999;21(6):471–88.
82. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O’Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349(24):2326–2333.
83. Gallagher MP, Hall B, Craig J, Berry G, Tiller DJ, Eris J. A randomized controlled trial of cyclosporine withdrawal in renal transplant recipients: 15-year results. *Transplantation* 2004;78(11):1653–1660.
84. Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009;9(11):2520–2531.
85. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation*. 2003;75(7):1034-40.
86. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant*. 2004;4(3):438-43.
87. Pei R, Lee JH, Shih NJ, et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 2003;75(1):43–49.
88. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, et al. Capillary C4d deposition in kidney allografts: A specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(4):1091–1099.
89. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* 2012;12(5):1157–1167.

90. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, et al. Banff meeting report writing committee: Banff 2013 meeting report: Inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014;14(2):272–283.
91. Gajardo M, Delucchi A, Pérez D, Cancino JM, Gálvez C et al. Long-term outcome of early steroid withdrawal in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant*. 2021;25(8):e14096 (e-pub).
92. Chaudri A, Izaqa M, Everly M, Ettenger R, Dharnidharka B et al. The clinical impact of humoral immunity in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2013;24(4):655-664.
93. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen J-P, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013; 369(13): 1215–1226.
94. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D et al. IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(1):293–304.
95. Valenzuela NM, Reed EF: Antibodies in transplantation: The effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury. *Methods Mol Biol* 2013;1034:41–70.
96. Cioni M, Nocera A, Innocente A, Tagliamacco A, Trivelli A, et al. De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Developing Early or Late after Transplant Are Associated with the Same Risk of Graft Damage and Loss in Nonsensitized Kidney Recipients. *J Immunol Res* 2017;e1747030. doi: 10.1155/2017/1747030 (e-pub).
97. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Rates and determinants of progression to graft failure in kidney allograft recipients with de novo donor-specific antibody. *Am J Transplant*. 2015;15(11):2921–2930.
98. Konvalinka A, Tinckam K. Utility of HLA antibody testing in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(7):1489–1502.
99. Heilman RL, Nijim A, Desemarteau YM, et al. De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation. *Transplantation*. 2014; 98(12): 1310–1315.
100. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation*. 2013;95(3):410–417.

101. Fotheringham J, Angel C, Goodwin J, et al. Natural history of proteinuria in renal transplant recipients developing de novo human leukocyte antigen antibodies. *Transplantation*. 2011;91(9):991–996.
102. H de Kort, Willicombe M, Brookes P, et al. Microcirculation inflammation associates with outcome in renal transplant patients with de novo donor-specific antibodies. *Am J Transplant*. 2013;13(2):485–489.
103. Loupy A, Legendre C. From Mean Fluorescence Intensity to C1q-Binding: The saga of anti-HLA donor-specific antibodies. *Transplantation*. 2015;99(6):1107-1108.
104. Kang ZY, Liu C, Liu W, Li DH. Effect of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies on the clinical outcomes of patients after renal transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Transpl Immunol* 2022;72:e.101566.(e-pub).
105. Sigurjonsdottir VK, Purington N, Chaudhuri A, Zhang BM, Fernandez-Vina M et al. Complement-binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies: biomarker for immunologic risk stratification in pediatric kidney transplantation recipients. *Transpl Int* 2022;35:e-pub.
106. Rush D, Gibson I. Subclinical inflammation in renal transplantation. *Transplantation* 2019;103:e139-e145(e-pub).
107. Arias M, Serón D, Herrero I, Rush DN, Wiebe C, et al. Subclinical antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2017;101(6):S1-S18.
108. Chapman J. Do protocol biopsies improve kidney transplant outcomes? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21(6):580-586.
109. Zotta F, Guzzo I, Morolli F, Diomedi-Camassei F, DelloStrologo L. Protocol biopsies in pediatric renal transplantation: a precious tool for clinical management. *Pediatr Nephrol* 2018;33(11):2167-2175.
110. Rush D, Arlen D, Boucher A, Busque S et al. Lack of benefit of early protocol biopsies in renal transplant patients receiving TAC and MMF: a randomized study. *Am J Transplant* 2007;7(11):2538-2545.
111. Pizzo H, Mirocha J, Choi J, Garrison J, Haas M, et al. Pre-transplant angiotensin II receptor type I antibodies in pediatric renal transplant recipients: An observational cohort study. *Pediatr Transplant*. 2022;26(8): e14400 (e-pub).

112. Lebraud E, Eloudzeri M, Rabant M, Lamarthee B, Anglicheau D. Microvascular inflammation of the renal allograft: a reappraisal of the underlying mechanisms. *Front Immunol* 2022;13:e864730(e-pub).
113. Delville M, Charreau B, Rabant M, Legendre C, Anglicheau D. Pathogenesis of non-HLA antibodies in solid organ transplantation: Where do we stand? *Hum Immunol*. 2016; 77(11):1055-1062.
114. Sampaio MS, Chopra B, Sureshkumar KK. Depleting antibody induction and kidney transplant outcomes: a paired kidney analysis. *Transplantation*. 2017;101(10):2527-2535.
115. Lasmar MF, Dutra RS, Nogueira-Machado JA et al. Effects of immunotherapy induction on outcome and graft survival of kidney-transplanted patients with different immunological risk of rejection. *BMC Nephrol*. 2019;20(1): e314 (e-pub).
116. Grenda R. Biologics in renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2015;30(7):1087-1098.
117. Höcker B, Kovarik JM, Daniel V, Opelz G, Fehrenbach H, et al. Pharmacokinetics and immunodynamics of basiliximab in pediatric renal transplant recipients on mycophenolate mofetil comedication. *Transplantation*. 2008;86(9):1234-1240.
118. Kho M, Bouvy A, Cadogan M, Kraaijeveld R, Baan CC, Weimar W. 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.
119. Offner G, Toenshoff B, Höcker B, Krauss M, Bulla M et al. Efficacy and safety of basiliximab in pediatric renal transplant patients receiving cyclosporine, mycophenolate mofetil, and steroids. *Transplantation*. 2008;86(9):1241-8.
120. Grenda R, Watson A, Vondrak K, Webb NJ, Beattie J, et al. A prospective, randomized, multicenter trial of tacrolimus-based therapy with or without basiliximab in pediatric renal transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6(7):1666-1672.
121. Grenda R, Watson A, Trompeter R et al. A randomized trial to assess the impact of early steroid withdrawal on growth in pediatric renal transplantation: the TWIST study. *Am J Transplant*. 2010;10(4):828-836.
122. Grenda R, Webb NJ. Steroid minimization in pediatric renal transplantation: Early withdrawal or avoidance? *Pediatr Transplant*. 2010 Dec;14(8):961-967.
123. Pape, L. State-of-the-art immunosuppression protocols for pediatric renal transplant recipients. *Pediatr. Nephrol*. 2019;34(2):187–194.

124. Haasova M, Snowsill T, Jones-Hughes T, Crathorne L, Cooper C et al. Immunosuppressive therapy for kidney transplantation in children and adolescents: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2016;20(61):1-324.
125. El-Zoghby Z, Stegall M, Lager D, Kremers W, Amer H et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2009;9(3):527-35.
126. Mendoza Rojas A, Hesselink D, van Besouw N, Baan C, van Gelder T. Impact of low tacrolimus exposure and high tacrolimus intra-patient variability on the development of de novo anti-HLA donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. *Expert Rev Clin Immunol* 2019;15(12):1323-1331.
127. Vicari-Christensen M, Repper S, Basile S, Young D. Tacrolimus: review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics to facilitate practitioners' understanding and offer strategies for educating patients and promoting adherence. *Prog Transplant*. 2009;19(3):277-284.
128. Van Gelder T. Drug interactions with tacrolimus. *Drug Saf*. 2002;25(10):707-712.
129. Miedziaszczyk M, Bajon A, Jakielska E, Primke M, Sikora J et al. Controversial interactions of tacrolimus with dietary supplements, herbs and food. *Pharmaceutics*. 2022;14(10): e2154 (e-pub).
130. Hochleitner BW, Bösmüller C, Nehoda H, Frühwirth M, Simma B, et al. Increased tacrolimus levels during diarrhea. *Transpl Int* 2001;14(4):230-233.
131. Frühwirth M, Fischer H, Simma B, Hochleitner B, Königsrainer A et al. Rotavirus infection as a cause of tacrolimus elevation in solid-organ-transplanted children. *Pediatr Transplant* 2001;5(2):88-92.
132. Stefanović N, Veličković-Radovanović R, Danković K, Pavlović I, Catić-Đorđević A, et al. Effect of the interrelation between CYP3A5 genotype, concentration/dose ratio and inpatient variability of tacrolimus on kidney graft function: Monte Carlo simulation approach. *Pharmaceutics*. 2021;13(11):e1970 (e-pub).
133. Piburn KH, Sigurjonsdottir VK, Indridason OS, Maestretti L, Patton MV, et al. Patterns in tacrolimus variability and association with de novo donor-specific antibody formation in pediatric kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2022;17(8): 1194-1203.
134. Ionescu L, Urschel S. Memory B-cells and long-lived plasma cells. *Transplantation*. 2019;103(5):890–898.

135. Wallin EF, Hill DL, Linterman MA, et al. The calcineurin inhibitor tacrolimus specifically suppresses human T follicular helper cells. *Front Immunol* 2018;9:1184 (e-pub).
136. Iwasaki K, Kitahata N, Hiramitsu T, et al. Increased CD40L+PD-1+ follicular helper T cells (Tfh) as a biomarker for predicting calcineurin inhibitor sensitivity against Tfh-mediated B-cell activation/ antibody production after kidney transplantation. *Int Immunol* 2018; 30(8):345–355.
137. Heidt S, Roelen DL, Eijsink C, et al. Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help. *Clin Exp Immunol* 2010;159(2):199–207.
138. Heidt S, Roelen DL, Eijsink C, et al. Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin. *Transplantation*. 2008;86(9):1292–1300.
139. Filler G, Todorova EK, Bax K, Alvarez-Elías AC, Huang SH, et al. Minimum mycophenolic acid levels are associated with donor-specific antibody formation. *Pediatr Transplant* 2016;20(1):34-38.
140. Van Gelder T, Hesselink DA. Mycophenolate revisited. *Transpl Int* 2015;28(5):508-515.
141. Pape L, Ahlenstiel-Grunow T. Diagnostics, treatment and immune response in BK Polyoma virus infection after pediatric kidney transplantation. *Pediatr Nephrol* 2020; 35(3):375-382.

Tabele źródłowe (24-29) zawierające dane o pacjentach objętych badaniami i obserwacją

Tabela 24. Grupa prospektywna - charakterystyka

ID	Płeć	Masa ciała (kg)	Wzrost (cm)	Wiek (lata)	Rozpoznanie choroby podstawowej	Data transplantacji	Schemat immunosupresji	Schemat immunosupresji	Zmiana schematu immunosupresji	Rodzaj zmiany	Stężenie kreatyniny po 1 mies.	Stężenie kreatyniny po 1 roku	Stężenie kreatyniny po 2 latach	eGFR 1 mies. po transplantacji	eGFR 1 rok po transplantacji	eGFR 2 lata po transplantacji	eGFR przy wykryciu dnDSA
101	M	47	166	14,2	nefronoftyza	2017-04-05	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		1,07	1,09	1,15	64	65	62	
102	M	18	104	5,5	guz Wilmsa	2017-04-13	Encorton_TAC_MMIF/AZA	tak	tak	MMF/AZA	0,42	0,51	0,56	102	87	87	
103	K	19	107	11,2	zespół Schimke	2017-04-13	Encorton_TAC	nie	nie		0,43	0,73	0,58	103	61	78	61
104	K	8	77	3,0	wrodzony zespół nerzycowy	2017-04-09	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		0,18	0,3	0,42	177	123	92	163
105	K	36	150	14,8	zespół hemolityczno-mocznicowy	2017-04-09	Encorton_CS_MMIF	nie	nie		0,97	1,07	0,98	64	58	64	
107	K	28	122	14,5	wada układu moczowego	2017-05-11	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		0,38	0,35	0,36	133	144	155	
108	M	25	133	11,6	wada układu moczowego	2017-05-24	Encorton_CS_MMIF	nie	nie		0,74	0,65	0,78	74	86	77	
109	M	26	129	11,8	FSGS	2017-07-31	Encorton_CS/TAC_MMIF	tak	tak	CS/TAC	0,71	0,79	0,8	75	69	72	
110	M	55	152	14,1	śródmiąższowe zapalenie nerek	2017-07-31	Encorton_TAC/CS_MMIF	tak	tak	TAC/CS	0,84	1,41	3,8	75	45	17	
111	K	12	83	2,1	zwężenie tętnicy nerkowej	2017-07-30	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		0,25	0,35	0,47	137	113	88	
112	K	42	155	16,5	torbielowatość nerek	2017-07-31	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		0,91	1,03		70	62		
113	K	45	138	10,4	nefronoftyza	2017-08-22	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		0,74	0,62	0,66	77	93	91	
115	M	66	173	17,1	wada układu moczowego	2017-08-30	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		0,8	0,78		89	92		92
116	K	24	123	9,3	FSGS	2017-08-30	Encorton_CS_MMIF	nie	nie		0,39	0,44	0,51	130	128	118	
117	M	50	170	15,4	wada układu moczowego	2017-10-03	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		1,57	1,65	1,76	45	43	40	
118	M	53	168	14,9	wada układu moczowego	2017-11-06	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		0,81	1,04	1,16	86	68	62	
119	M	56	167	15,2	choroba Denta	2017-12-22	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		2,8	3,86	5	25	18	14	
120	K	45	167	14,3	nefronoftyza	2017-12-22	Encorton_TAC_MMIF	nie	nie		0,77	0,69	0,78	90	101	92	91

ID	Płeć	Masa ciała (kg)	Wzrost (cm)	Wiek (lata)	Rozeznanie choroby podstawowej	Data transplantacji	Schemat immunosupresji	Zmiana leczenia immunosupresyjnego	Rodzaj zmiany	Stężenie kreatyniny po 1 mies.	Stężenie kreatyniny po 1 roku	Stężenie kreatyniny po 2 latach	eGFR 1 mies. po transplantacji	eGFR 1 rok po transplantacji	eGFR 2 lata po transplantacji	eGFR przy wykryciu dnDSA
121	K	26	137	11,2	FSGS	2018-01-03	Encorton_CSA_MMF	nie		0,8	0,78	0,77	71	75	78	
122	M	52	167	14,9	wada układu moczowego	2018-01-03	Encorton_TAC_MMF	nie		1,46	1,44	1,31	47	48	54	
123	M	64	183	16,9	wada układu moczowego	2018-01-13	Encorton_TAC_MMF	nie		1,03	1,05		73	72		
125	M	31	144	14,3	nefropatia niedokrwienna	2018-01-13	Encorton_CS/TAC_MMF	tak	CS/TAC	0,71	1,58	2,29	84	38	27	30
126	M	46	162	16,2	nieznana	2018-01-20	Encorton_TAC_MMF	nie		0,93	1,29		72	52		
127	K	27	132	11,2	nieznana	2018-02-01	Encorton_TAC_MMF	nie		0,72	0,44	0,51	76	132	118	
128	M	76	156	12,6	torbiełowatość nerek	2018-02-14	Encorton_TAC/CS_MMF	tak	TAC/CS	0,9	0,91	0,8	72	73	86	
129	M	14	94	2,4	wada układu moczowego	2018-02-25	Encorton_TAC_MMF	nie		0,39	0,39	0,4	100	108	107	
132	M	10	79	2,4	wada układu moczowego	2018-02-01	Encorton_TAC_MMF	nie		0,45	0,61		73	64		79
133	K	18	112	8,0	nieznana	2018-03-21	Encorton_TAC_MMF	nie		0,27	0,34	0,4	171	148	135	
135	K	12	84	5,7	wada układu moczowego	2018-05-17	Encorton_TAC_MMF	nie		0,29	0,44	0,38	120	85	102	
137	M	23	120	7,0	torbiełowatość nerek	2018-05-17	Encorton_TAC_MMF	nie		0,52	0,59	0,73	95	88	75	
138	M	51	158	13,9	wada układu moczowego	2018-06-11	Encorton_TAC_MMF	nie		0,6	0,77	0,74	109	87	94	
139	M	26	125	8,8	nieznana	2018-06-13	Encorton_TAC_MMF	nie		0,53	0,71	0,78	97	77	74	93
142	M	32	130	9,3	wada układu moczowego	2018-04-20	Encorton_TAC_MMF	nie		0,77	0,83	0,77	70	67	75	
144	M	39	157	14,3	wada układu moczowego	2018-05-28	Encorton_TAC_MMF	nie		0,8	1,17	1,34	81	57	51	49
145	M	9	81	3,4	nefropatia niedokrwienna	2018-08-17	Encorton_TAC_MMF/AZA	tak	MMF/AZA	0,6	0,68	0,97	56	51	40	
146	M	17	102	4,5	wada układu moczowego	2018-10-27	Encorton_TAC_MMF/AZA	tak	MMF/AZA	0,8	0,69	0,81	53	65	60	
148	M	48	139	10,3	torbiełowatość nerek	2018-10-27	Encorton_TAC_MMF	nie		1,14	1,09	1,09	50	54	55	
149	K	19	113	9,7	wada układu moczowego	2018-10-04	Encorton_CS_MMF	nie		0,5	0,67	0,86	93	76	64	

Tabela 25. Grupa restrospektywna - charakterystyka

ID	Płeć	Masa ciała (kg)	Wzrost (cm)	Wiek (lata)	Rozpoznanie choroby podstawowej	Data transplantacji	Schemat immunosupresji	Zmiana schematu immunosupresji	Rodzaj zmiany	Stężenie kreatyniny po 2 latach od transplantacji	Stężenie kreatyniny 2 lata przed dnDSA	Stężenie kreatyniny 1 rok przed dnDSA	Stężenie kreatyniny przy wykryciu dnDSA	eGFR 1 mies. po transplantacji	eGFR 2 lata po transplantacji	eGFR 2 lata przed dnDSA	eGFR 1 rok przed dnDSA	eGFR przy wykryciu dnDSA
151	M	31	144	9,9	wada układu moczowego	2011-10-17	Encorton_TAC_MMIF/SRL	tak	MMF/SRL	0,72	0,88	0,96	1	73	88	78	74,43	53,23
152	K	28	142	11,3	kłębuszkowe zapalenie nerek	2012-06-23	Encorton_TAC_MMIF	nie		0,81	0,99	0,98	1	93	78	64	66,59	51,15
154	K	12	92	3,8	zespół nerczycowy	2004-04-09	Encorton_CS/TAC_MMIF	tak	CS/TAC	0,4	0,51	0,78	1	95	112	119	80,48	60,39
155	K	23	128	9,3	zespół nerczycowy	2006-11-16	TAC_MMIF	nie		0,63	0,89	1,06	1	66	97	79	67,02	59,05
157	K	16	102	7,7	wada układu moczowego	2013-06-01	Encorton_TAC_MMIF	nie		0,51	0,42	0,68	1	136	97	108	74,10	51,92
158	M	35	141	11,8	zespół hemolityczno-mocznicowy	2011-12-06	Encorton_TAC_MMIF	nie		0,6	0,58	0,67	2	92	105	106	96,78	28,35
159	M	23	128	9,9	wada układu moczowego	2002-09-30	Encorton_TAC_MMIF	nie		1,6	1,52	1,47	2	66	37	39	40,18	30,55
161	M	10	90	2,4	wada układu moczowego	2012-05-16	Encorto_CS_SIR	nie		0,66	0,63	0,69	1	133	67	70	66,44	51,74
162	M	21	106	6,8	ARPKD	2011-05-24	Encorton_TAC_MMIF	nie		0,59	0,78	1,15	1	69	77	62	45,97	64,24
164	M	11	87	2,5	nefropatia niedokrwienna	2012-12-04	Encorto_CS_SIR	nie		0,48	0,47	0,59	1	138	83	84	75,60	57,22
166	M	18	112	5,0	wada układu moczowego	2005-06-22	Encorton_TAC/SIR_MMIF	tak	TAC/SIR	0,6	0,85	0,98	1	66	83	73	68,27	65,52
167	M	17	108	9,3	zespół Schimke	2013-07-10	Encorton_TAC/CS	tak		0,75	0,75	0,7	1	61	59	59	65,49	71,78
169	K	17	107	8,1	ARPKD	2004-09-17	Encorton_CS_MMIF	nie		0,9	1,15	1,2	1	78	56	50	49,90	47,02
170	M	12	98	6,2	zespół Fanconiego	2005-01-27	Encorton_CS/TAC_MMIF	tak	CS/TAC	0,8	1,09	1,55	1	80	56	48	35,70	38,53
171	M	18	111	5,8	wada układu moczowego	2012-05-21	Encorton_TAC_SIR	nie		0,84	0,84	2,57	3	52	55	55	18,80	17,41

ID	Płeć	Masa ciała (kg)	Wzrost (cm)	Wiek (lata)	Rozpoznanie choroby podstawowej	Data transplantacji	Schemat immunosupresji	Zmiana schematu immunosupresji	Rodzaj zmiany	Stężenie kreatyniny po 2 latach od transplantacji	Stężenie kreatyniny 2 lata przed dNSA	Stężenie kreatyniny 1 rok przed dNSA	Stężenie kreatyniny przy wykryciu dNSA	eGFR 1 mies. po transplantacji	eGFR 2 lata po transplantacji	eGFR 2 lata przed dNSA	eGFR 1 rok przed dNSA	eGFR przy wykryciu dNSA
172	M	28	128	9,3	oksalozja	2009-05-03	Encorton_TAC_MMIF	nie		1,89	2,49	2,79	3	45	29	24	22,80	20,52
173	M	24	122	8,4	zespół nerczycowy	2007-10-20	Encorton_MMIF_CS/SIR	tak	CS/SIR	1,05	1,06	1,29	2	78	50	52	44,50	35,79
174	K	17	105	6,2	zespół nerczycowy	2006-04-21	Encortron_ICA_MMIF	nie			0,6	1,51	4	87		78	32,00	12,73
175	K	28	137	11,9	zespół nerczycowy	2009-12-03	Encorton_CS/TAC_MMIF	tak	CS/TAC	0,7	0,69	0,75	5	110	91	90	85,35	14,65
176	M	12	86	2,5	wada układu moczowego	2009-06-07	Encorton_TAC_MMIF/AZA	tak	MMF/AZA		0,45	0,43	1	96	81	81	92,20	48,42
177	K	34	140	12,0	wada układu moczowego	2012-06-05	Encortron_CS_MMIF	nie		1,43	0,86	1,19	2	32	41	67	48,59	28,75
178	K	44	148	13,1	FSGS	2011-07-10	Encorton_TAC_MMIF	nie					5	54				12,59
179	K	41	151	12,4	wada układu moczowego	2012-06-22	Encorton_TAC_MMIF	nie		1,46	1,67	1,71	2	49	44	39	37,92	36,22
180	M	30	127	8,7	wada układu moczowego	2013-04-20	Encorton_CS/TAC_MMIF	tak	CS/TAC			0,86	5	47			61,47	11,64
181	M	15	99	4,2	nefropatia niedokrwienienna	2007-07-29	Encorton_SIR_MMIF	nie		0,61	1,01	1,12	1	82	74	64	59,00	59,00
182	M	18	106	5,3	wada układu moczowego	2004-10-29	Encorton_TAC_MMIF	nie		0,5	0,58	1,18	2	49	98	100	52,15	34,45
183	K	13	134	4,2	wada układu moczowego	2012-05-31	Encorton_TAC_MMIF	nie		1,16	0,55	1,16	1	180	42	84	42,01	40,97
184	M	30	127	8,5	nefropatia niedokrwienienna	2007-09-29	Encorton_TAC_MMIF	nie		0,82	0,77	0,87	1	40	68	79	73,11	40,71
185	M	13	87	2,9	wada układu moczowego	2006-06-29	Encorton_CS_MMIF	nie		0,61	0,69	0,77	1	60	68	77	73,48	85,59

Tabela 26. Grupa prospektywna - immunologia

ID	HLA A biorca	HLA B biorca	HLA DR biorca	HLA A dawca	HLA B dawca	HLA DR dawca	Niezgodność HLA A	Niezgodne HLA B	Niezgodność HLA DR	Aktualne PRA (%)	Czas obserwacji (lata)	Obecność DSA po transplantacji
101	23, 24	44, -	1, 7	3, 23	7, 44	7, 15	1	1	1	0	2	nie
102	1_2	8_60	3_4	1_2	8_44	3_7	0	1	1	0	2	nie
103	3, 32	13, 44	7, -	1, 2	8, 44	3, 7	2	1	1	0	2	tak
104	2_-	7_58	15_17	26_32	7_51	3_13	2	1	2	0	2	tak
105	11_23	27_44	4_13	26_32	7_51	4_13	2	2	0	0	2	nie
107	1_23	8_44	7_17	1_11	8_13	7_17	1	1	0	0	2	nie
108	3_31	7_39	1_15	3_32	35_64	1_15	1	2	0	0	2	nie
109	11_26	27_35	7_11	1_68	57_62	7_-	2	2	0	0	2	nie
110	1_26	44_52	7_13	29_31	44_60	15_-	2	1	1	0	2	nie
111	2_26	27_38	13_16	1_68	57_62	7_-	2	2	1	0	2	nie
112	32_66	7_41	11_13	29_31	44_60	15_-	2	2	1	0	1	nie
113	1_2	27_39	1_11	1_2	8_44	3_4	0	2	2	0	2	nie
115	1_32	7_13	4_15	1_25	18_57	4_11	1	2	1	0	1	tak
116	1_25	18_51	4_11	1_25	18_57	4_11	0	1	0	0	2	nie
117	2_24	27_44	1_16	2_68	27_44	7_16	1	0	1	0	2	nie
118	3_31	35_51	1_-	24_31	38_51	1_14	1	1	1	0	2	nie
119	24_26	8_61	3_11	1_26	7_55	7_11	1	2	1	0	2	nie
120	1_2	8_39	3_11	1_26	7_55	7_11	1	2	1	0	2	tak

ID	HLA A biorca	HLA B biorca	HLA DR biorca	HLA A dawca	HLA B dawca	HLA DR dawca	Niezgodność HLA A	Niezgodne HLA B	Niezgodność HLA DR	Aktualne PRA (%)	Czas obserwacji (lata)	Obecność DSA po transplantacji
121	3_23	13_44	7_11	1_2	8_13	7_17	2	1	1	0	2	nie
122	2_26	8_44	7_17	1_2	8_13	7_17	1	1	0	0	2	nie
123	2_3	7_-	15_-	24_25	7_18	15_-	2	1	1	0	1	nie
125	1_2	7_8	15_17	24_25	7_18	15_-	2	1	0	0	2	tak
126	2_32	60_57	7_13	2_-	18_44	7_14	0	2	1	0	1	nie
127	2_-	40_44	12_13	2_32	44_60	7_11	1	1	2	0	2	nie
128	3_31	35_39	7_16	2_30	13_37	7_15	2	2	1	0	2	nie
129	32_-	44_64	7_13	24_31	13_39	7_15	2	2	1	0	2	nie
132	29_68	44_57	7_-	2_32	44_60	7_11	2	1	1	0	1	tak
133	11_32	27_51	1_4	2_-	49_51	9_13	1	1	2	0	2	nie
135	2_24	13_57	7_-	2_11	35_60	7_8	1	2	1	0	2	nie
137	2_33	14_57	1_7	2_11	35_60	7_8	1	2	1	0	2	nie
138	3_24	7_62	11_13	1_2	27_35	11_13	1	2	0	0	2	nie
139	2_-	41_57	4_7	2_25	18_57	7_15	1	1	1	0	2	tak
142	23_68	35_-	8_14	2_26	35_56	1_8	2	1	1	0	2	nie
144	2_24	7_44	4_16	1_-	7_44	4_13	2	0	1	0	2	tak
145	2_26	18_38	4_11	2_68	7_65	12_17	1	2	2	0	2	nie
146	2_-	18_51	11_15	2_31	44_51	13_15	1	1	1	0	2	nie
148	2_26	27_52	1_15	2_31	44_51	13_15	1	2	1	0	2	nie
149	1_30	13_37	7_10	2_30	13_27	7_16	1	1	1	0	2	nie

Tabela 27. Grupa restrospektywna- immunologia

ID	HLA A biorca	HLA B biorca	HLA DR biorca	HLA A dawca	HLA B dawca	HLA DR dawca	Niezgodność HLA A	Niezgodne HLA B	Niezgodność HLA DR	Aktualne PRA (%)	Czas obserwacji (lata)	Obecność DSA po transplantacji
151 2_66	15_41	7_13	30_68	18_56	7_11	2	2	2	1	0	8	tak
152 3_-	18_44	1_11	3_24	35_44	1_11	1	1	1	0	0	10	tak
154 2_11	35_57	7_8	3_-	35_60	1_11	1	1	1	2	0	11	tak
155 26_34	7_40	4_15	1_-	8_57	3_7	1	1	2	2	0	12	tak
157 1_3	7_51	11_15	2_31	51_61	11_-	2	2	1	0	0	9	tak
158 2_3	44_62	1_7	2_30	18_27	1_3	1	1	2	1	0	10	tak
159 2_3	7_62	3_8	1_2	8_15	3_14	1	1	1	1	0	12	tak
161 2_24	38_40	7_8	24_-	27_61	7_8	0	1	1	1	0	7	tak
162 3_-	7_-	15_-	24_31	8_27	3_4	2	2	2	2	0	15	tak
164 1_2	27_35	1_14	11_33	51_65	1_4	2	2	2	1	0	6	tak
166 1_-	8_-	17_-	11_31	51_52	7_15	2	2	2	2	0	13	tak
167 1_3	8_35	11_17	1_24	8_44	11_17	1	1	2	0	0	6	tak
169 1_3	18_40	11_-	2_3	40_51	11_13	1	1	1	1	0	8	tak
170 2_-	27_62	11_15	2_24	15_40	4_11	1	1	2	1	0	11	tak
171 3_29	7_40	11_13	2_11	51_58	3_9	2	2	2	2	0	5	tak

ID	HLA A biorca	HLA B biorca	HLA DR biorca	HLA A dawca	HLA B dawca	HLA DR dawca	Niezgodność HLA A	Niezgodne HLA B	Niezgodność HLA DR	Aktualne PRA (%)	Czas obserwacji (lata)	Obecność DSA po transplantacji
172	11_26	27_55	9_11	1_2	8_57	8_11	2	1	2	0	7,3 tak	
173	1_3	16_27	1_6	2_19	35_41	1_6	2	2	0	0	10 tak	
174	2_25	44_45	4_7	1_24	8_44	3_11	2	1	2	0	4,5 tak	
175	2_3	51_-	11_13	2_-	7_51	13_15	0	1	1	0	6 tak	
176	2_24	62_56	16_13	2_33	15_44	4_7	1	1	2	0	8 tak	
177	3_24	18_39	8_14	11_25	18_52	1_13	2	1	2	0	4 tak	
178	11_26	27_44	11_16	2_24	44_-	7_14	2	0	2	0	2 tak	
179	2_11	44_52	1_16	2_25	18_44	4_16	1	1	1	0	6 tak	
180	2_11	13_55	7_11	2_23	39_44	7_11	1	2	0	0	1,3 tak	
181	2_11	35_60	1_7	2_3	18_35	1_11	1	1	1	0	13 tak	
182	1_2	8_35	3_8	2_-	44_50	3_15	0	2	1	0	12 tak	
183	1_-	7_8	3_15	1_30	8_13	7_15	1	1	1	0	7 tak	
184	3_24	14_40	11_13	2_26	7_41	1_13	2	2	1	0	9 tak	
185	3_24	7_35	8_15	3_26	7_18	10_16	1	1	2	0	12 tak	

Tabela 28. Grupa prospektywna - immunosupresja

ID	Stężenie programu 1 mies. po transplantacji	Stężenie programu 3 mies. po transplantacji	Stężenie programu 6 mies. po transplantacji	Stężenie programu 12 mies. po transplantacji	Stężenie programu 18 mies. po transplantacji	Stężenie programu 24 mies. po transplantacji	Mediana stężeń programu	CV (%) programu	Skala Vasudev 1 mies. po transplantacji	Skala Vasudev 12 mies. po transplantacji	Skala Vasudev 24 mies. po transplantacji
101	16,5	7,2	3,9	7,4	8,4	6,3	6,6	0,26	10	6,6	6
102	6,9	4,8	4,9	5,7	10,6	4,8	6,2	0,41	13,3	10,5	3,9
103	7,9	7,5	6,7	6,3	6,1	4,6	6,2	0,17	7,7	2,9	2,8
104	9,2	8,2	5,1	7,1	5,4	5,0	6,2	0,23	11,1	6,2	6,5
105	26	12,8	14	17,0	8,6	13,0	13,1	0,23	10,5	6,3	5,2
107	9,7	8,6	7,8	6,5	8,0	9,2	8,0	0,13	9,8	5,6	4,9
108	21	14	13	11,0	8,2	10,0	11,2	0,21	10,4	8	7,5
109	24	10	8,2	6,5	4,6	7,4	7,3	0,27	11,5	6,35	5,35
110	12,2	6,5	10,5	13,0	10,0	19,0	11,8	0,39	7,4	4,8	4,4
111	8	8,3	8,1	5,3	6,1	5,6	6,7	0,21	10,8	7,2	5,4
112	6,8	7,3	9,2	6,6			7,7	0,17	10,7	6,9	
113	7,4	10,4	10	7,0	5,2	6,9	7,9	0,28	8,2	5,8	5,3
115	7	9,9	8	9,3			9,1	0,11	7,6	5,5	
116	16	13	20	6,9	6,0	4,8	10,1	0,63	10	5,6	4,9
117	11,6	7	6,8	7,5	7,3	7,3	7,2	0,04	12,5	3,2	3,2
118	13,5	8,1	6,6	8,5	6,7	9,6	7,9	0,16	11,2	5,7	5,2
119	8,7	10,5	5,5	7,2	4,8	5,3	6,7	0,35	10,2	3,5	3,75
120	10,6	8	12	4,0	6,9	6,8	7,5	0,38	13	5,3	5,9

ID	Stężenie programu 1 mies. po transplantacji	Stężenie programu 3 mies. po transplantacji	Stężenie programu 6 mies. po transplantacji	Stężenie programu 12 mies. po transplantacji	Stężenie programu 18 mies. po transplantacji	Stężenie programu 24 mies. po transplantacji	Mediana stężen programu	CV (%) programu	Skala Vasudev 1 mies. po transplantacji	Skala Vasudev 12 mies. po transplantacji	Skala Vasudev 24 mies. po transplantacji
121	23	9,7	14	14,0	10,0	13,0	12,1	0,18	28	7	6,6
122	19,8	5	6,6	4,9	13,6	7,5	7,5	0,47	8,2	5,5	4,8
123	11,1	6,7	11,4	8,1			8,7	0,28	8,6	3	
125	7,2	8,5	6	6,7	7,1	5,5	6,8	0,17	10,4	8,4	4
126	7,9	5	9,3	6,5			6,9	0,31	15,2	7,7	
127	9,1	7,5	9,1	6,8	7,1	6,4	7,4	0,14	11,5	7	5,9
128	16,8	23	15	14,0	5,4	9,2	13,3	0,50	7,9	5,8	6
129	7,1	6,9	9,1	5,7	16,9	13,6	10,4	0,45	11	7,8	5,7
132	7,5	5,7	13,9	6,8	5,0		7,9	0,52	9	6,1	
133	10,7	6,1	8,4	5,6	7,6	3,5	6,2	0,30	7,8	6	4,1
135	9	6	8,8	4,6	4,8	7,7	6,4	0,29	13,8	11,3	12,6
137	11,6	7,8	6,9	6,0	5,9	5,8	6,5	0,13	8,8	3,1	3,9
138	12,6	7,5	7,4	7,4	5,8	6,5	6,9	0,11	7	5,1	3,6
139	13,2	10,1	5	6,1	5,9	7,9	7,0	0,29	10,6	6,1	3,8
142	7,7	5,5	8,5	8,4	6,6	5,9	7,0	0,20	15,1	6,8	8,5
144	11,5	10,7	5,3	10,0	5,5	7,5	7,8	0,32	10,9	6,9	4,1
145	8,5	6,8	6,1	6,0	9,6	6,2	6,9	0,22	17	6,7	5,6
146	8,6	7	6,8	5,2	6,9	5,0	6,2	0,16	8,5	7	6,8
148	13,4	7,9	8,1	10,3	6,9	8,1	8,3	0,15	14,7	4,3	4
149	21	12	8,2	6,4	9,8	8,2	8,9	0,24	10,7	6,5	5,4

Tabela 29 Grupa retrospektywna - immunosupresja

ID	Stężenie programu 3mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 6mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 9mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 12mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 18mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 24mies. przed wykryciem DSA	Mediana stężeń programu	CV (%) programu	Skala Vasudev 24 mies. po transplantacji	Skala Vasudev 24 mies. przed wykryciem DSA	Skala Vasudev 12 mies. przed wykryciem DSA	Skala Vasudev przy wykryciu DSA
151	7,10	4,70	4,90	3,2	5,1	7,0	5,0	0,28	2,1	3	2,6	1,7
152	5,30	4,20	4,20	4,2	4,9	8,2	5,1	0,30	4,8	4,5	3	4
154	6,60	6,60	6,00	6,2	6,0	6,9	6,3	0,06	6	4,1	4,5	4,5
155	8,00	5,60	5,60	8,4	9,0	7,4	7,2	0,20	3,4	3,9	3,5	3,5
157	2,60	4,60	3,80	5,9	7,4	3,3	5,0	0,39	7,2	6,3	6,4	5,6
158	5,90	8,60	8,30	7,7	7,9	2,6	7,0	0,33	4,2	4,5	3,6	1,5
159	3,90	5,70	3,50	6,1	8,2	8,0	6,3	0,34	5,1	4,2	4,7	4,7
161	4,92	4,38	5,38	5,0	3,9	1,6	4,1	0,33	3,9	2,4	3	2,7
162	4,00	4,30	4,60	2,6	3,0	3,8	3,7	0,21	3,2	2,5	3,3	2,8
164	8,85	8,46	10,62	5,4	5,8	6,9	7,4	0,26	4,1	4,1	3,8	3,8
166	5,25	9,90	5,58	5,1	8,5	8,3	7,5	0,29	3,3	3	2,7	2,5
167	8,80	4,40	9,00	5,2	11,8	5,9	7,3	0,37	5,4	5,4	3,5	5,1
169	9,31	7,46	6,92	6,6	6,9	10,3	7,6	0,19	9,9	9	7,6	5,2
170	9,00	7,85	6,20	6,0	5,3	6,0	6,3	0,21	7,9	6,6	6,2	5,4
171	3,10	3,80	4,30	6,8	3,4	2,4	4,1	0,39	6,9	6,9	6,1	4,7

ID	Stężenie programu 3mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 6mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 9mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 12mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 18mies. przed wykryciem DSA	Stężenie programu 24mies. przed wykryciem DSA	Mediana stężeń programu	CV (%) programu	Skala Vasudev 24 mies. po transplantacji	Skala Vasudev 24 mies. przed wykryciem DSA	Skala Vasudev 12 mies. przed wykryciem DSA	Skala Vasudev przy wykryciu DSA
172	4,30	3,60	3,80	4,8	3,3	3,6	3,8	0,14	3,9	3,9	3,5	3,4
173	5,60	5,50	3,38	6,0	8,0	4,2	5,4	0,29	8,2	4,3	3,5	3,3
174	6,69	7,80	5,30	7,6	5,1	4,2	6,0	0,24		7,4	7,4	7,4
175	6,30	4,20	10,00	6,0	6,6	5,3	6,4	0,31	8	7,9	7,3	6,2
176	14,30	7,40	6,40	8,5	7,4	7,2	7,4	0,34		7,5	7,9	4,2
177	8,23	9,08	21,23	5,1	10,3	8,2	10,8	0,54	3,6	15,3	3,3	2,7
178	12,60	6,40	2,50	5,9	5,5	10,2	6,1	0,50				5,1
179	6,10	12,90	4,70	5,0	6,6	7,3	7,3	0,42	8	3,7	4	4,5
180	5,10	6,30	8,60	7,1	4,0	5,6	6,3	0,26			7,5	6,24
181	6,39	8,54	4,59	3,9	5,2	4,6	5,4	0,31	4,2	2,1	1,8	1,8
182	6,20	4,10	5,00	4,7	6,7	5,1	5,1	0,18	6,2	4,1	4	2,9
183	3,90	4,00	5,60	9,1	3,2	6,4	5,7	0,41	8,1	8,2	8,2	6,5
184	5,50	5,50	4,90	5,4	9,6	5,4	6,2	0,29	4,4	3,8	4	4,3
185	3,62	7,62	4,77	7,4	0,0	0,2	4,0	0,85	6,3	5	7	6,4