

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ LEKARSKI

mgr Milena Maria Przybylska

**Porównanie działania nefroprotekcyjnego
bezpośredniego inhibitora reniny (aliskirenu) i inhibitora
receptora AT₁ dla angiotensyny II (losartanu) u chorych po
przeszczepieniu nerki**

Praca na stopień doktora nauk medycznych wykonana w
Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Promotor

Dr hab. n. med. Sławomir Lizakowski

GDAŃSK 2018

Pragnę złożyć na ręce *Pana dr hab. med. Sławomira Lizakowskiego*

Promotora niniejszej rozprawy serdeczne podziękowania i wyrazy uznania za podjęty przez Pana ogromny trud nie tylko w jej redagowanie, ale przede wszystkim zaangażowanie, dzięki któremu moja praca mogła powstać. Za dokonanie rzeczy „niemożliwych”, poświęcony mi czas, nieocenioną pomoc, cierpliwość, bardzo cenne uwagi i konstruktywne sugestie, motywację, wskazanie profesjonalnej bibliografii oraz opiekę merytoryczną, dzięki której możliwe było nadanie ostatecznego kształtu mojej rozprawie.

Składam ogromne podziękowania na ręce *Pana Profesora dr. hab. n. med. Marcina Gruchały, Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego* oraz *Pani Ewy Volkmann* za wyrozumiałość oraz za to, że otrzymałam szansę, by pomimo wielu trudności moja rozprawa mogła powstać.

Cytując jedną z wcielanych w życie myśli Pana Profesora Rutkowskiego, która towarzyszyła mi podczas pisania niniejszej rozprawy: „(...) *Nie ma rzeczy niemożliwych, a mogą być jedynie trudne do realizacji*” - dziękuję *Panu Profesorowi dr. hab. n. med. Bolesławowi Rutkowskiemu, byłemu Kierownikowi Katedry i Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego* oraz *obecnemu Kierownikowi Katedry i Kliniki, Pani Profesor dr. hab. n. med. Alicji Dębskiej-Ślizień* za zapewnienie profesjonalnego warsztatu pracy, ale również za przychylność, możliwość skorzystania z Państwa ogromnej wiedzy i twórczości naukowej.

Serdecznie dziękuję *Panom Profesorom: Leszkowi Tylickiemu, Marcinowi Renke oraz Przemysławowi Rutkowskiemu, Panu Doktorowi Zbigniewowi Heleniakowi* - Osobom głęboko zaangażowanym w realizację wspólnego projektu badawczego i wszystkim Osobom niewymienionym z imienia i nazwiska za owocną i pomyślną współpracę w przeprowadzeniu badania klinicznego poświęconego mojej rozprawie.

Podziękowania kieruję również do
Pani Profesor Sylwii Małgorzewicz oraz Pań Doktor: Ewy Aleksandrowicz-Wrony i Anny Owczarzak za współuczestnictwo i nadzór w wykonywanych przeze mnie analizach laboratoryjnych.

*Rozprawę doktorską dedykuję
mojemu najdroższemu
Synowi Leonardowi*

Milena Przybylska

SPIS TREŚCI.....	s. 4
WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	s. 6
1. WSTĘP.....	s. 8
1.1. Transplantacja nerki (TN) i rozwój przewlekłej dysfunkcji przeszczepionej (PDNP).....	s. 8
1.1.1. Epidemiologia przewlekłej choroby nerek (PChN).....	s. 8
1.1.2. Przeszczepienie nerki optymalną metodą leczenia nerkozastępczego.....	s. 8
Śródmiąższowe włóknienie/zanik cewek (IF/TA).....	s. 12
Przebieg kliniczny IF/TA.....	s. 12
Obraz histopatologiczny PDNP.....	s. 13
Patomechanizmy przewlekłego uszkodzenia nerki przeszczepionej.....	s. 13
Rola aktywacji układu renina–angiotensyna–aldosteron (RAAs) w uszkodzeniu nerki przeszczepionej.....	s. 16
Układ RAA w stanach fizjologii.....	s. 16
Rola RAAs w progresji chorób nerek.....	s. 18
Nefroprotekcja.....	s. 23
Nefroprotekcja u chorych po przeszczepieniu nerki.....	s. 23
1.2. Farmakologiczna blokada RAAs jako podstawowe założenie nefroprotekcji.....	s. 29
Zagrożenia ze stosowania blokady układu RAA.....	s. 31
Rola blokady układu renina–angiotensyna–aldosteron jako potencjalnej opcji terapeutycznej w postępowaniu nefroprotekcijnym chorych z PDNP.....	s. 32
Optymalizacja farmakologicznej blokady osi RAA u chorych po przeszczepieniu nerki.....	s. 35
Poszukiwanie nowych metod leczenia nefroprotekcijnego u chorych po przeszczepieniu nerki – rola aliskirenu.....	s. 38

ROZDZIAŁ 2. CELE PRACY.....	s. 41
ROZDZIAŁ 3. MATERIAŁ I METODY.....	s. 42
Typ badania.....	s. 42
Populacja badania.....	s. 42
Schemat badania.....	s. 49
Stosowane leczenie.....	s. 51
Metodyka.....	s. 52
Metody statystyczne.....	s. 55
ROZDZIAŁ 4. WYNIKI.....	s. 57
Wskaźnik albumina/kreatynina w moczu (UACR).....	s. 57
Całodobowe ambulatoryjne monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi (ABPM).....	s. 58
Podsumowanie uzyskanych wyników i graficzna prezentacja wybranych parametrów po 8 tygodniowych okresach terapeutycznych.....	s. 59
Zależność pomiędzy redukcją białkomoczu a zmianą ciśnienia tętniczego krwi w trakcie terapii aliskirenem i losartanem.....	s. 60
Wpływ badanych terapii na biomarkery uszkodzenia cewkowo–śródmiaższowego, stresu oksydacyjnego i włóknienia nerki przeszczepionej.....	s. 64
Monitorowanie profilu bezpieczeństwa i tolerancji zastosowanych terapii.....	s. 67
ROZDZIAŁ 5. DYSKUSJA.....	s. 75
ROZDZIAŁ 6. WNIOSKI.....	s. 96
ROZDZIAŁ 7. PIŚMIENNICTWO.....	s. 98
ROZDZIAŁ 8. ANEKS.....	s. 115

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW:

ABPM	całodobowe ciągłe ambulatoryjne monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi
ACE-i lub IKA	inhibitory konwertazy angiotensyny I
AKI	ostre uszkodzenie nerek
Ang II	angiotensyna II
ARA	antagoniści receptorów AT ₁ dla angiotensyny II (sartany)
ARO lub PRA	aktywność reninowa osocza (aktywność enzymatyczna reniny)
BMI	wskaźnik masy ciała
CCB	blokery kanału wapniowego
CChN	cukrzycowa choroba nerek
CNI	inhibitory kalcyneuryny
CsA	cyklosporyna A
CVD	choroby układu sercowo – naczyniowego
DBP	rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi
DGF	opóźniona czynność przeszczepu
DRI	bezpośredni inhibitor reniny (aliskiren)
ECM	macierz pozakomórkowa
eGFR	oszacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej
ESRD lub SNN	schyłkowa niewydolność nerek
GFR	wskaźnik filtracji kłębuszkowej
IF/TA	przewlekłe włóknienie śródmiąższowe z zanikiem (atrofią) cewek nerkowych
KTRs	biorcy alloprzeszczepu nerkowego
MCRB	blokery receptora mineralokortykoidowego

NT	nadciśnienie tętnicze
PAI-1	inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1
PChN	przewlekła choroba nerek (własnych)
PDNP lub CRAD	przewlekła dysfunkcja nerki przeszczepionej
PPC	stężenie proreniny w osoczu krwi
PRC	stężenie reniny w osoczu krwi
PRR	receptor dla (pro)reniny
PTE	potransplantacyjna nadkrwistość
RAAs	układ renina - angiotensyna - aldosteron
SBP	skurczowe ciśnienie tętnicze krwi
Scr	stężenie kreatyniny w surowicy krwi
TAC	takrolimus
TN lub KTx	transplantacja nerki
UACR	wskaźnik stężenia albuminy (mg) do kreatyniny (g)

ROZDZIAŁ 1. WSTĘP

1.1. Transplantacja nerki (TN) i rozwój przewlekłej dysfunkcji przeszczepionej (PDNP)

1.1.1. Epidemiologia przewlekłej choroby nerek (PChN)

Dynamiczny rozwój chorób cywilizacyjnych takich jak cukrzyca, nadciśnienie tętnicze (NT) i otyłość oraz starzenie się społeczeństw, jest powodem znaczącego wzrostu liczby chorych z Przewlekłą Chorobą Nerek (PChN) w większości regionów na świecie, w tym także w Polsce^{1,2,3,4}. W samych Stanach Zjednoczonych rozpoznaje się 100 tys. nowych przypadków PChN w ciągu roku⁵. Liczebność tej populacji według przybliżonych szacunków może wzrosnąć niemal dwukrotnie w ciągu następnych dziesięciu lat^{1,6,7}. Wyniki badań epidemiologicznych prowadzonych w różnych rejonach świata (NHANES III-USA, AusDiab-Australia, PREVEND-Holandia, POLNEF Polska) wykazały, że łącznie na świecie PChN występuje u ponad 600 mln ludzi, natomiast w Polsce problem ten może dotyczyć ponad 4 milionów osób^{8,9}. Tak dynamiczny rozwój PChN powoduje, że coraz większa liczba chorych wymaga leczenia nerkozastępczego, a tym samym w ciągu ostatniej dekady ubiegłego stulecia, światowa populacja chorych dializowanych powiększała się średnio o około 7% na rok. W roku 2001 leczonych dializami było na świecie około 1,1 mln chorych, natomiast w 2011 roku 2,16 mln, a w 2015 roku liczba pacjentów korzystających z dializ wzrosła do 2,8 mln^{10,11}. W 2003 roku w Polsce włączono do dializ 3973 chorych, z kolei w roku 2016 leczenie nerkozastępcze rozpoczęto u 5716 chorych¹². Nie należy przy tym zapominać o tym, że PChN stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych oraz śmiertelności z tym związanej¹³. Szczególnie na tego typu powikłania narażeni są chorzy w starszym wieku i chorzy z cukrzycą, którzy stanowią coraz liczniejszą grupę pośród dializowanych.

Obecna sytuacja epidemiologiczna PChN wymaga wdrożenia wielokierunkowych działań, które mają na celu z jednej strony spowolnienie postępu uszkodzenia nerek (działania nefroprotektoryjne), a z drugiej strony optymalne wykorzystanie dostępnych możliwości leczenia nerkozastępczego w celu wydłużenia życia pacjentów i poprawy jego jakości.

1.1.2. Przeszczepienie nerki optymalną metodą leczenia nerkozastępczego

Przeszczepienie nerki (TN) jest powszechnie uznana za najlepszą metodę leczenia nerkozastępczego chorych ze schyłkową niewydolnością nerek (*ang. end-stage renal disease; ESRD*). Zarówno badania obserwacyjne, jak też dane rejestrowe wskazują na poprawę przeżycia chorych po przeszczepieniu nerki w porównaniu do podobnej kohorty chorych

dializowanych, ale pozostających na liście oczekujących. Wyniki takie obserwowano w różnych grupach pacjentów, niezależnie od wieku i czynników obciążających^{10,14,15}. Wprowadzenie nowych metod leczenia immunosupresyjnego spowodowało, że na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat uzyskano istotne zmniejszenie częstości incydentów ostrego odrzucania oraz znaczną poprawę wyników krótkoterminowego przeżycia graftu, natomiast przeżycie długoterminowe przeszczepionych nerek nie poprawiło się tak wyraźnie. Obecnie ponad 95% przeszczepionych nerek funkcjonuje przez okres roku, 75% przez 5 lat, a u około 60% biorców funkcja nerki jest utrzymana przez okres 10 lat^{16,17}. Najlepsze wyniki uzyskują chorzy przeszczepiani przed rozpoczęciem dializoterapii (przeszczepienie wyprzedzające, *ang. pre-emptive*), a szczególnie, jeżeli otrzymują nerkę od dawców żywych^{14,18}. Udałe przeszczepienie nerki poza poprawą przeżywalności biorców oferuje także wiele innych korzyści. Istnieje również argument ekonomiczny takiego postępowania, ponieważ leczenie chorego z przeszczepioną nerką, za wyjątkiem pierwszego roku po przeszczepieniu, jest też znacząco tańsze dla systemu opieki zdrowotnej, aniżeli terapia chorego pozostającego na dializie. Ograniczeniem tej metody leczenia jest wciąż utrzymująca się dysproporcja pomiędzy liczbą dostępnych narządów do przeszczepienia, a rosnącym na nie zapotrzebowaniem. Jednym z powodów takiego stanu jest wciąż niezadowalający czas przeżycia przeszczepionych nerek. W rezultacie chorzy, u których dochodzi do upośledzenia funkcji przeszczepionej nerki wracają na listę oczekujących i przyczynia się to do wydłużenia czasu oczekiwania na przeszczepienie pozostających tam chorych. Dane z USA wskazują, że liczba oczekujących na przeszczepienie nerki wynosiła na koniec 2013 roku ponad 88 tys. chorych i było to ponad 30 tys. więcej aniżeli w roku 2009^{5,10}. Także dane rejestrów europejskich, w tym Poltransplantu, pokazują rosnącą dysproporcję pomiędzy liczbą osób oczekujących, a liczbą wykonywanych przeszczepień nerki¹⁹.

Niestety, w chwili niedoboru narządów do transplantacji przeszczepienie optymalnego dawcy dla dobrego biorcy (młody biorca *pre-emptive* od młodego dawcy) jest sytuacją dość rzadką, wobec czego należy rozważyć wszystkie elementy mogące poprawić wyniki przeszczepienia oraz wydłużyć okres funkcjonowania nerki w pozostałych grupach chorych (np. starszy biorca i/lub dawca). Utrzymanie długo funkcjonującego graftu może poprawić sytuację chorych oczekujących na przeszczepienie, ponieważ chorzy tracący nerkę nie będą „zasilać” listy oczekujących na przeszczepienie i stopniowo jej wydłużać. Trzeba

jednocześnie zwrócić uwagę, że do głównych przyczyn utraty nerek przeszczepionych (obok zgonu z funkcjonującym greftem) należy proces postępującego uszkodzenia przeszczepu (CRAD – *ang. chronic renal allograft dysfunction*), prowadzący w większości przypadków do stopniowego pogarszania czynności przeszczepionej nerki i powrotu chorych do leczenia dializami lub konieczności retransplantacji.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że przeszczepienie nerki jest najlepszą metodą leczenia nerkozastępczego i istnieje wiele dowodów na to, że prawidłowo funkcjonujący greft powoduje cofanie, zahamowanie lub przynajmniej spowolnienie niekorzystnych następstw PChN²⁰. Choć rokowania dotyczące długości życia i jego jakości pacjentów po przeszczepieniu nie są takie jak w populacji ogólnej, to jednak mogą być do nich zbliżone.

Tabela 1

Immunologiczne i nieimmunologiczne czynniki ryzyka rozwoju i progresji śródmiąższowego włóknienia/zaniku cewek (IF/TA)

<u>Czynniki immunologiczne</u>
➤ Status immunologiczny biorcy, zwłaszcza jego wysoka immunizacja przed, jak i po TN ➤ Liczba epizodów oraz typ ostrego odrzucania przeszczepu (AR; <i>ang. acute rejection</i>), w tym o przebiegu subklinicznym rozpoznane na podstawie biopsji protokolarnych ➤ Stopień zgodności antygenów w układzie HLA ➤ Nieadekwatna siła (suboptymalna) stosowanej immunosupresji po KTx ➤ Przewlekła aktywna odpowiedź humoralna (<i>ang. chronic-antibody mediated rejection; CAMR</i>) i/lub komórkowa wobec alloantygenów dawcy
<u>Czynniki nie - immunologiczne</u>
➤ Nadciśnienie tętnicze (NT) u biorcy i/lub dawcy narządu ➤ Białkomocz/albuminuria ➤ Palenie tytoniu ➤ Hiperfiltracja w obrębie kłębuszków nerkowych ➤ Zaburzenia lipidowe

- Starszy wiek dawcy i biorcy narządu, zarówno żywego, jak i zmarłego
- Typ dawcy: żywy vs zmarły
- Przyczyna zgonu dawcy, szczególnie choroby sercowo - naczyniowe (CVD) czy naczyniowo - mózgowe (CVD)
- Przeszczepienie pochodzące od dawcy o tzw. rozszerzonych kryteriach kwalifikacyjnych (*ang. expanded/extended criteria donors; ECD*)
- Współchorobowość biorcy
- Czynniki genetyczne dawcy i/lub biorcy narządu
- Rasa, pochodzenie etniczne dawcy i biorcy (wyniki przeszczepiania nerek lepsze u Europejczyków vs Afroamerykanie)
- Różnica płci i masy ciała dawcy oraz biorcy
- „Jakość” narządu dawcy w chwili transplantacji, sposób jego przechowywania oraz doświadczenie ośrodka
- Uszkodzenie niedokrwienno–reperfuzyjne nerki przeszczepionej
- Przedłużony czas trwania ciepłego i/lub zimnego niedokrwienia nerki
- Infekcje (zwłaszcza: *Polyomavirus hominis* 1 i 2, cytomegalowirus (CMV), koronawirus (BCV) czy gram-ujemna bakteremia po TN)
- Choroba podstawowa nerek natywnych – przyczyna PChN
- Typ histopatologiczny uszkodzenia przeszczepionej nerki (m.in. zmiany typu IF/TA, nawrót pierwotnej lub wtórnej glomerulopatii czy choroby układowej lub metabolicznej w nerce przeszczepionej, choroba *de novo* w przeszczepionym narządzie), szczególnie współwystępowanie kilku złożonych patologii w grafacie
- *Non-adherence* (nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych oraz brak aktywnej współpracy pacjenta z lekarzami)
- Wystąpienie opóźnionej czynności przeszczepionej nerki po zabiegu transplantacji (*ang. delayed graft function; DGF*)
- Czas przeszczepienia, szczególnie dłuższy czas trwania dializoterapii przed przeszczepieniem (> 6 miesięcy) vs transplantacje wyprzedzające

Śródmiąższowe włóknienie/zanik cewek (IF/TA)

Przez wiele lat funkcjonował termin *przewlekłej nefropatii nerki przeszczepionej* (ang. *chronic allograft nephropathy; CAN*), który w ostatnich latach został zastąpiony określeniem *przewlekłej dysfunkcji nerki przeszczepionej* (PDNP; ang. *chronic renal allograft dysfunction- CRAD*), a obecnie używany jest termin IF/TA (ang. *interstitial fibrosis/tubular atrophy*). Pojęcie *przewlekłego uszkodzenia nerki przeszczepionej* ma szerszy charakter niż określenie *przewlekłej nefropatii nerki przeszczepionej i przewlekłego odrzucania (zależnego od przeciwciał i/lub komórkowego)*, ponieważ obejmuje całą grupę różnych przyczyn postępującego uszkodzenia przeszczepionego narządu, u podłoża którego leżą zarówno czynniki immunologiczne, jak i nieimmunologiczne (tabela 1)^{15,16}. PDNP jest to wieloczynnikowy kliniczno-patologiczny proces chorobowy, w następstwie którego dochodzi do zwłóknienia miąższu i zaniku cewek nerkowych (IF/TA), które to w zasadzie są jego istotą. Klinicznie proces ten charakteryzuje się stopniowym ubytkiem przesączania kłębuszkowego, białkomoczem i nadciśnieniem tętniczym. Poszczególne czynniki uszkadzające nerkę przeszczepioną są często powiązane ze sobą patogenetycznie np. w trakcie uszkodzenia nerki w przebiegu odrzucania zależnego od przeciwciał dochodzi do rozwoju białkomoczu, który to jest przyczyną występowania zaburzeń lipidowych i tym samym czynniki te potęgują swoje niekorzystne oddziaływanie^{20,21,22,23}. PDNP jest stwierdzane u 25% biorców nerki w pierwszym roku, a w 10. roku po przeszczepieniu stwierdzana jest nawet u 90%²⁴. PDNP stanowi drugą, po zgonie pacjenta, przyczynę utraty nerki przeszczepionej i dotyczy około 5% chorych rocznie, zatem stanowi istotną barierę w poprawie odległych wyników przeszczepiania.

Przebieg kliniczny IF/TA

Klasyczna triada typowych, ale niespecyficznych, objawów klinicznych IF/TA obejmuje^{23,25,26,27,28}:

- wolno narastający białkomocz, zazwyczaj o charakterze subnerczycowym (1-2 g/dobę), który najczęściej poprzedza wzrost stężenia kreatyniny w surowicy (Scr)
- pojawienie się *de novo* lub pogorszenie kontroli istniejącego wcześniej nadciśnienia tętniczego (NT)
- stopniowy, najczęściej powolny, ubytek filtracji kłębuszkowej, co w konsekwencji u części chorych doprowadza do schyłkowej niewydolności nerki przeszczepionej

Należy podkreślić, iż przebieg kliniczny PDNP jest nieco odmienny aniżeli PChN w nerkach własnych^{20,29,30}. Mimo, że progresja do schyłkowej niewydolności graftu jest wolniejsza w porównaniu do choroby nerek własnych, to jednak objawy kliniczne są bardziej nasilone przy mniejszym upośledzeniu filtracji kłębuszkowej i są często nieadekwatne do stopnia zaawansowania niewydolności nerki przeszczepionej, tj. nawet 10-krotnie częściej występuje niedokrwistość, bardziej nasilone są zaburzenia metaboliczne i niedożywienie^{31,32}.

Obraz histopatologiczny PDNP

Najczęściej w obrazie histopatologicznym biopsji protokolarnych i/lub diagnostycznych pacjentów z przewlekłym uszkodzeniem przeszczepionej nerki stwierdza się zmiany o typie śródmiąższowego włóknienia/zaniku cewek (IF/TA)^{25,33,34,35,36}. Częstość występowania IF/TA, przewlekłego odrzucania zależnego od przeciwciał, czy nawrotu glomerulopatii w przeszczepionej nerce wzrasta wraz z upływem czasu od zabiegu transplantacji^{37,38,39}. Zaawansowanie obserwowanych zmian jest ważnym czynnikiem determinującym długość przeżycia graftu. Zmiany typu IF/TA zgodnie z klasyfikacją banffijską obejmują dwie charakterystyczne odrębne fazy: pierwsza z nich (*etap wczesny*) to uszkodzenie cewkowo-śródmiąższowe, natomiast druga pojawia się najczęściej po roku od TN (*etap późny*) i obejmuje postępujące uszkodzenie mikrokrażenia nerkowego z przewlekłą waskulopatią (arteriolopatią) oraz towarzyszącą przewlekłą glomerulopatią przeszczepu wraz z dalszą progresją włóknienia śródmiąższowego i zaniku cewkowego, prowadząc w rezultacie do całkowitej utraty funkcji przeszczepionej nerki²⁵. Jak wykazał Nankivell B.J. i wsp. ciągu pierwszych 5-10 lat od zabiegu transplantacji obraz umiarkowanej i ciężkiej postaci przewlekłej nefropatii przeszczepu (CAN - taka terminologia obowiązywała w czasie publikacji pracy) występować może nawet od około 66% przypadków, natomiast łagodna jej postać nawet u 100% chorych^{24,34}.

Patomechanizmy przewlekłego uszkodzenia nerki przeszczepionej

Patogeneza przewlekłej dysfunkcji przeszczepu ma charakter złożony. Proces ten rozwija się najczęściej po roku od zabiegu przeszczepienia i charakteryzuje się klinicznie powolnym postępującym spadkiem filtracji kłębuszkowej w powiązaniu z nadciśnieniem tętniczym i białkomoczem. Zmianom naczyniowym typu *endarteritis* towarzyszą wykładniki zapalenia toczącego się w śródmiąższu i w cewkach (*tubulitis*), a następnie włóknienie śródmiąższowe i

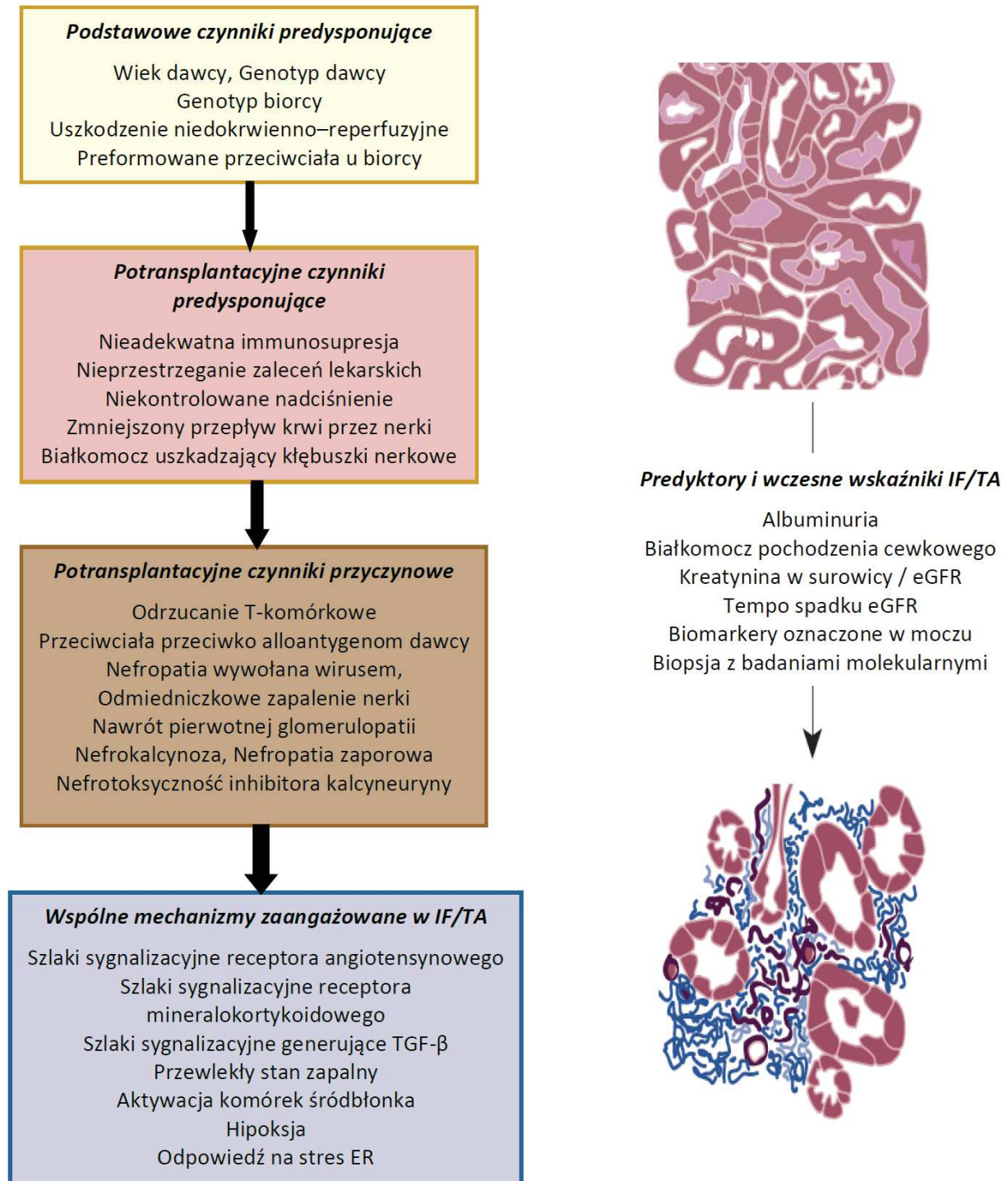
zanik cewek (IF/TA). W świetle nowych badań, główną przyczyną PDNP nie jest jak dotąd sądzono nefrotoksyczność inhibitorów kalcyneuryny, lecz toczący się w przeszczepie proces immunologiczny przewlekłego odrzucania humoralnego (*ang. antibody-mediated rejection; AMR*) związany z nieadekwatną immunosupresją. Typowa jest przy tym obecność rozlanych linijnych złogów C4d w kapilarach okołocewkowych kory i rdzenia nerki, a także stwierdzenie we krwi biorcy przeciwciał anti-HLA specyficznych dla antygenów dawcy (*ang. donor-specific antibodies; DSA*). Uważa się, iż PDNP najczęściej jest wynikiem zachodzących jednocześnie, wyżej wymienionych, procesów przewlekłego odrzucania o podłożu immunologicznym (szczególnie humoralnym - AMR) oraz szeregu przyczyn nieimmunologicznych (tabela 1). Wobec istotnego znaczenia czynników nieimmunologicznych w uszkodzeniu nerki przeszczepionej, warto wspomnieć o udziale w tym procesie nadciśnienia tętniczego oraz białkomoczu, jako modyfikowalnych czynnikach ryzyka przeżycia graftu oraz biorcy^{2,3,20,28,40}. Oba te czynniki są przyczyną hiperfiltracji „napędzającej” dalsze uszkodzenie nerki przeszczepionej powodując nadciśnienie wewnątrz kapilar kłębuszków, uszkodzenie podocytów, niszczenie nefronów, przerost i twardnienie kłębuszków nerkowych oraz wywoływanie wtórnych zmian w śródmiąszu nerki^{26,41,42,43}.

Uważa się, że obie grupy czynników - zależnych (immunologicznych) i niezależnych od antygeny (nieimmunologicznych) wydają się odgrywać równie istotną rolę w przewlekłym uszkodzeniu alloprzeszczepu nerkowego, mając addytywny efekt w skróceniu czasu jego przeżycia^{44,45}. Dowiedziono, iż większość mechanizmów nieimmunologicznych wzmaga siłę procesów zależnych od antygenów (m.in. AMR), zwiększając immunogenność przeszczepu oraz wywołując kaskadę niekorzystnych zmian w nerce. W rezultacie sprzyja to rozwojowi i/lub zwiększa ryzyko przyspieszonej progresji PDNP i w końcowym efekcie wpływa na pogorszenie wyników przeszczepiania nerek²². Przebieg i zależności pomiędzy poszczególnymi mechanizmami uszkodzenia nerki przeszczepionej przedstawiono na ryc. 1.

Rycina 1.

Patomechanizm IF/TA

(według H. Amer and M.D. Griffin, Kidney Int., 2014, 85)



Legenda: eGFR - oszacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej, ER – retikulum endoplazmatyczne, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu- β

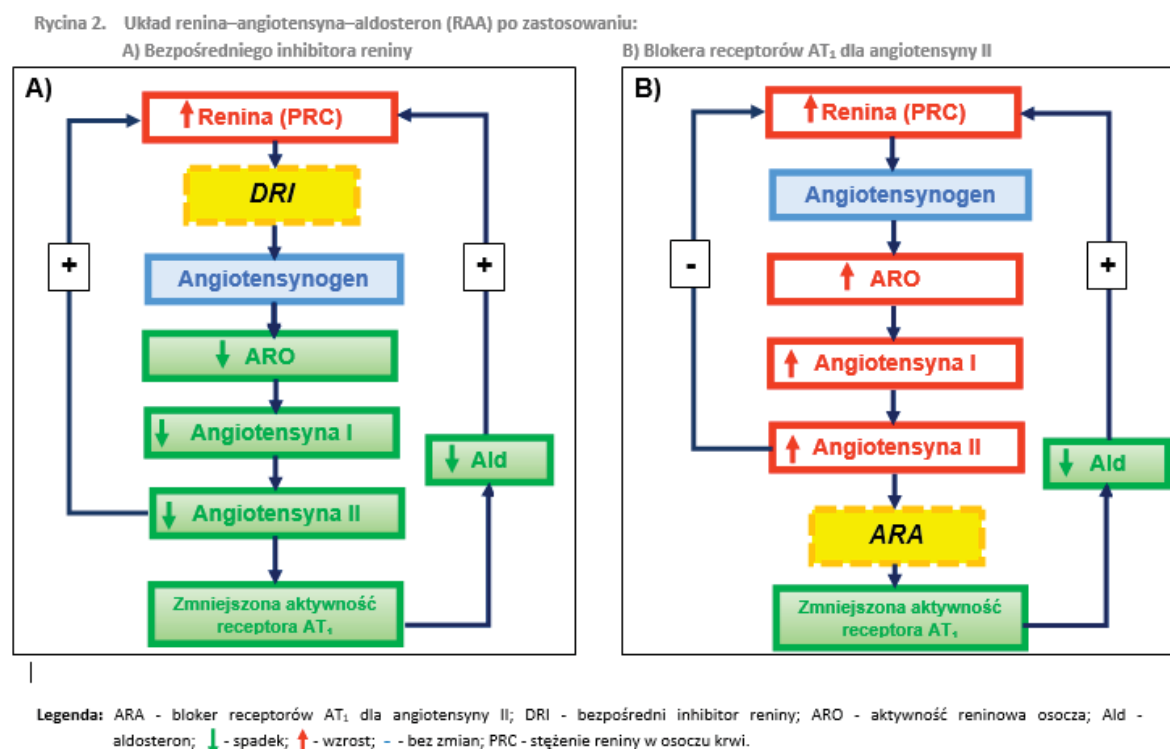
Rola aktywacji układu renina–angiotensyna–aldosteron (RAAs) w uszkodzeniu nerki przeszczepionej

Układ RAA w stanach fizjologii

Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAs) odgrywa kluczową rolę w regulacji ciśnienia tętniczego oraz utrzymaniu homeostazy wodno-elektrolitowej. W skład RAAs wchodzi enzymy i hormony, których aktywatorem jest renina wytwarzana i magazynowana głównie w aparacie przykłębuszkowym. W ostatnich latach dowiedziono, że prorenina i renina są produkowane nie tylko w nerkach, lecz także w tkance mózgowej, siatkówce, jądrach, jajnikach, nadnerczach, sercu, makrofagach, limfocytach T, granulocytach oraz łożysku^{46,47}. Renina należy do grupy enzymów proteolitycznych (angiotensynaz) i zbudowana jest z 347 aminokwasów o masie cząsteczkowej ok. 42 tys. Da. Prekursorem tego enzymu jest preprorenina, która ulega przemianie do proreniny, a następnie do w pełni aktywnej reniny. Transformacja ta może odbywać się szlakiem proteolitycznym (odszczepienie przez enzymy proteolityczne od proreniny N-końcowego 43-aminokwasowego polipeptydu) lub nieproteolitycznym (zmiana konformacji N-końcowego polipeptydu proreniny). Procesy te kolejno zachodzą w aparacie przykłębuszkowym, a następnie w krwi⁴⁸. Sygnałem do wytwarzania tego enzymu jest obniżenie ciśnienia w obrębie tętniczki doprowadzającej kłębuszka, zmniejszenie ładunku sodu docierającego do komórek płamki gęstej zlokalizowanej w ścianie cewki dystalnej, pobudzenie receptorów β -adrenergicznych komórek aparatu przykłębuszkowego oraz prostaglandyny E₂, I₂ i kininy. Natomiast wydzielanie reniny zmniejszają: angiotensyna II (w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrotnego), wazopresyna, przedsionkowy peptyd natriuretyczny i adenozyne^{4,49}.

Kluczowe znaczenie dla funkcjonowania RAAs ma receptor dla (pro)reniny (PRR), który zlokalizowany jest w podocytach, komórkach mezangium i cewkach nerkowych oraz pozanerkowo w ścianach naczyń, mózgu i sercu^{46,47}. Receptor ten wiąże z równym powinowactwem reninę oraz proreninę. Związanie proreniny z PRR powoduje zmiany jej konformacji i prowadzi do nieproteolitycznej aktywacji tego enzymu. Tak aktywowana prorenina, podobnie jak renina, jest zdolna do wiązania angiotensynogenu i przekształcania go do angiotensyny I, która następnie przekształcana jest przy udziale enzymu konwertującego angiotensynę 1 (*ang. angiotensin converting enzyme 1; ACE-1*) do

angiotensyny II (Ang II), głównego efektora biologicznego RAAs. Bardzo istotny jest też fakt, że angiotensyna II ma zdolność zwrotnego hamowania syntezy reniny (rycina 2).



Należy również pamiętać, że istnieją inne drogi przemiany peptydów angiotensynowych. Angiotensyna II może bowiem powstawać szlakiem, w którym ACE-1 zastępują inne enzymy proteolityczne, głównie chymaza, ale też katepsyna G oraz wrażliwy na chymostatynę enzym generujący angiotensynę II (CAGE). Ponadto z angiotensynogenu przy udziale inhibitora ACE-2, zlokalizowanego głównie w obrębie cewek proksymalnych, powstają inne peptydy o działaniu niejednokrotnie przeciwnym do angiotensyny II (np. angiotensyna 1–9, 1–7 i 1–5). Najbardziej poznane jest w tym zakresie działanie angiotensyny (1–7). Ustalono bowiem, że wywiera ona działanie antyproliferacyjne i wazodylatacyjne poprzez wpływ przez swoisty receptor, tak zwany *mas* receptor (*masR*)⁵⁰. Angiotensyna (1–7) ogranicza włóknienie naczyń, poprzez hamowanie szlaku sygnalizacyjnego kinaz MAP, zmniejsza krzepliwość krwi oraz nasila natriurezę, wykazując tym samym działanie antagonistyczne do pobudzenia receptora AT_1 przez angiotensynę II. Dla działania angiotensyny II istotne znaczenie ma istnienie dwóch typów receptorów błonowych, a mianowicie AT_1 i AT_2 , poprzez które wywiera ona swoje działania biologiczne. Pobudzenie receptora AT_1 powoduje zwiększenie ciśnienia tętniczego krwi, uwolnienie aldosteronu, przebudowę naczyń oraz indukuje stres oksydacyjny i procesy zapalne.

Niekorzystnymi następstwami tego pobudzenia jest nasilenie procesów włóknienia narządowego. W nerkach ekspresję receptorów AT₁ stwierdza się w podocytach, komórkach cewek proksymalnych, dystalnych i zbiorczych oraz komórkach plamki gęstej. Ponadto są one zlokalizowane na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego, mięśni gładkich naczyń krwionośnych, komórek kory nadnerczy oraz wielu innych tkanek i narządów. Pobudzenie AT₁ w tętnicze odprowadzającej kłębuszka nerkowego prowadzi do wzrostu oporu naczyniowego w jego obrębie^{51,52}, natomiast w obrębie naczyń doprowadzających (aferentnych) kłębuszka, Ang II pobudza zarówno receptory AT₁, jak też AT₂ o przeciwnych właściwościach, co w efekcie powoduje zrównoważone działanie naczyniorozszerzające i obkurczające w tym miejscu^{50,53,54}. Korzystne jest zatem pobudzenie receptorów AT₂, ponieważ prowadzi do wazodylatacji, hamowania syntezy czynników wzrostowych i w konsekwencji przynosi efekt przeciwzapalny oraz przeciwmiażdżycowy, natomiast poprzez blokowanie receptora AT₁ jest możliwa interwencja farmakologiczna ograniczająca niekorzystne efekty aktywacji RAAs⁵⁵.

Rola RAAs w progresji chorób nerek

Aktywacja układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAs), zarówno ogólnoustrojowego, jak i lokalnego (w tym wewnątrznerkowego) jest dobrze udowodnionym mechanizmem mającym istotny udział w uszkodzeniu nerek^{56,57,58}. Najsilniejszym efektem RAAs jest angiotensyna II, która przez szereg niekorzystnych mechanizmów hemodynamicznych i niehemodynamicznych może prowadzić do postępu choroby nerek.

Niekorzystne efekty działania Ang II

- Wzrost systemowego ciśnienia tętniczego krwi

Nadmierna aktywacja układu RAA za sprawą swoistych efektorów t.j. dla proreniny, reniny, Ang II i aldosteronu prowadzi do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi głównie poprzez silne właściwości obkurczające naczynia krwionośne, ale też przy współudziale jednego z najsilniej działających endogennych związków wazokonstrykcyjnych, jakim jest endotelina-1 (ET₁). Dodatkowo dochodzi do zwiększonego wychwytu sodu przez kanaliki proksymalne⁵¹. W następstwie dochodzi do wzrostu napięcia oraz oporu naczyniowego i zwężenia naczyń mikrokrążenia nerkowego wraz z ich uszkodzeniem (szklwieniem arterioli)^{53,54,55}.

- Wzrost ciśnienia wewnątrz-kłębuszkowego

Efekt ten spowodowany jest przede wszystkim faktem odmiennego działania angiotensyny II na naczynia doprowadzające i odprowadzające kłębuszków nerkowych. Pobudzenie receptorów AT₁ w naczyniach odprowadzających, które występują tam w większej liczbie, prowadzi do wzrostu oporu naczyniowego w tych naczyniach. Równolegle w obrębie naczyń doprowadzających mamy do czynienia ze zrównoważonym działaniem naczynio-rozszerzającym i naczynio-obkurczającym angiotensyny II. Udowodniono bowiem, że angiotensyna II pobudza w tym miejscu zarówno receptory AT₁ odpowiedzialne za skurcz naczyń, jak również receptory AT₂, których aktywacja daje efekt przeciwny. Inną przyczyną wzrostu ciśnienia wewnątrz-kłębuszkowego jest utrata autoregulacji mikrokrążenia nerkowego, co powoduje wazodylatację tętniczki doprowadzającej, wskutek czego ciśnienie systemowe z dużych naczyń jest przenoszone bezpośrednio na kłębuszek⁷. U chorych po przeszczepieniu nerki, powyższe niekorzystne zjawiska może nasilać stosowanie inhibitorów kalcyneuryny (*ang. calcineurin inhibitors; CNI*). Leki te zwiększają ekspresję receptorów dla Ang II, modyfikują ekspresję genu dla endoteliny-1 powodując zwiększenie jej aktywności, a także wywołują efekt ogólnoustrojowej wazokonstrykcji (w tym naczyń tętniczek doprowadzających kłębuszka) na drodze innych mechanizmów^{25,59,60,61}.

- Hiperfiltracja i uszkodzenie kłębuszków nerkowych

Powyżej przedstawione mechanizmy przyczyniają się do hiperperfuzji w czynnych nefronach wraz z hiperfiltracyjnym ich uszkodzeniem, w następstwie czego w późniejszym etapie dochodzi do hipoperfuzji, spowodowanego nim niedokrwienia i niedotlenienia śródmiąższu nerki wraz z przerostem pozostałych czynnych nefronów. W efekcie nasilona jest aktywacja układu RAA z wszelkimi tego konsekwencjami, co prowadzi do zmniejszenia filtracji kłębuszkowej^{7,21,62}.

- Uszkodzenie podocytów

Wysokie stężenie Ang II to również jeden z istotnych czynników uszkadzających podocyta, ponieważ aktywuje w podocytach program apoptozy, co skutkuje ich uszkodzeniem doprowadzając do podocytopenii. W podocytach, które nie uległy apoptozie, pod wpływem Ang II dochodzi do rearanżacji białek cytoszkieletu, co powoduje zanik wypustek stopowatych. Takie zmiany strukturalne podocytów przyczyniają się do osłabienia ich wiązania z błoną podstawną kłębuszka, przez co mogą one ulegać „złuszczeniu” do przestrzeni Bowmana^{7,52}.

- Indukcja stresu oksydacyjnego

Istotny jest także udział osi RAA w zwiększeniu aktywności oksydazy NAD(P)H, która stymuluje AT-1/NAD(P)H oksydazo-zależne wytwarzanie wolnych rodników tlenowych, zmniejszające biodostępność tlenku azotu (NO) i nasilające stres oksydacyjny, zwłaszcza w naczyniach^{56,63}.

- Działanie prozapalne oraz proliferacyjne

Ang II jako główny „nefrotoksyczny” efektor hormonalny RAAs, pełni rolę cytokiny prozapalnej stymulującej nacieki limfocytów w kłębuszkach nerkowych, jak i w śródmiąższu nerek⁵⁶. Wykazano, iż Ang II jest ważnym czynnikiem mogącym zwiększać zarówno proliferację i aktywację limfocytów T oraz komórek NK, co może mieć niekorzystne implikacje u pacjentów po transplantacji^{56,58}. Dochodzi także do rozplemienia mezangium w obrębie kłębuszków oraz proliferacji miocytów i dysfunkcji śródbłona naczyniowego. Doprowadza do tego wiele mechanizmów, a mianowicie stymulacja mitogenezy, wzmożona synteza i aktywacja mediatorów zapalnych, zwiększona ekspresja genów odpowiedzialnych za syntezę i uwalnianie molekuł adhezyjnych, chemokin zapalnych, cytokin profibrotycznych oraz czynników wzrostu [m.in. transformujący czynnik wzrostu β -1 (TGF- β 1), płytkowy czynnik wzrostu-beta (PDGF- β), czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF), insulinopodobny czynnik wzrostu, czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu śródbłona naczyniowego (VEGF) i czynnik martwicy nowotworów- α (TNF- α)]^{51,52,53,56}. Mediatorzy zapalenia wraz z nasiloną ekspresją molekuł adhezyjnych, tj. ICAM - 1 (*ang. intercellular adhesion molecule-1; międzykomórkowe cząstki adhezyjne*) oraz czynników chemotaktycznych, t.j. RANTES (*ang. regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*) i MCP-1 (*ang. monocyte chemotactic protein-1; czynnik chemotaktyczny dla makrofagów i monocytów*) oraz dodatkowo interleukina 6 (IL-6) indukują migrację komórek stanu zapalnego, powodując zwiększony napływ, aktywację i infiltrację makrofagów tkankowych do wnętrza przeszczepionej nerki⁶⁰.

- Działanie profibrotyczne

Mechanizmem promującym uszkodzenie graftu jest także nadmierna sekrecja cytokin profibrotycznych (szczególny w tym udział TGF- β 1), chemokin, czynników wzrostu oraz wzmożona produkcja kolagenu poprzez zwiększoną syntezę i depozycję białek macierzy pozakomórkowej (ECM) oraz upośledzenie tempa ich biodegradacji. Odbywa się to za pośrednictwem hamowania aktywności enzymów proteolitycznych (proteinaz), w tym głównie aktywności fibrynolitycznej metaloproteinaz (*ang. matrix metalloproteinases*;

MMPs), czyli enzymów zaangażowanych w degradację białek i innych komponentów (m.in. cząsteczek sygnałowych i adhezyjnych, kolagenu) macierzy pozakomórkowej oraz śródmiąższowej tkanki łącznej. Bardzo ważną rolę odgrywa też aktywacja inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), będącego głównym inhibitorem enzymatycznej degradacji ECM^{7,54,64,65,66}.

- Wzrost liczby i ekspresji receptorów AT₁ dla Ang II

Udowodniono, że u chorych leczonych glikokortykoidami oraz pod wpływem aldosteronu dochodzi do wzrostu liczby i zwiększenia ekspresji receptorów AT₁, co zwiększa wrażliwość komórek docelowych na działanie Ang II^{8,20,54,56}. Ekspresja wspomnianych receptorów zwiększa się także pod wpływem stresu oksydacyjnego oraz wielu innych stanów patologicznych, decydując o intensywności oddziaływania RAAs⁵⁶.

- Działanie prozakrzepowe

Aktywność antyfibrynolityczna Ang II powoduje aktywację układu krzepnięcia, co wraz z nasileniem agregacji płytek krwi oraz zwiększonej lepkości krwi wywołuje stan nadkrzepliwości^{7,8,51,56}.

- Wzmoczona aktywacja układu współczulnego

Układ współczulny pozostaje w ścisłym związku z układem RAA i oba te układy wzajemnie się aktywują na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego. Przy pobudzeniu układu współczulnego dochodzi zatem do potęgowania się niekorzystnych efektów aktywacji RAAs^{53,54,67,68}.

Niekorzystne efekty aldosteronu

Oprócz Ang II, ważnym efektem układu RAA jest aldosteron, który może niezależnie od Ang II podwyższać ciśnienie tętnicze krwi, indukować procesy zapalne i włóknienia w nerkach oraz przebudowę małych i średnich naczyń. Działanie to odbywa się głównie za pośrednictwem aktywacji receptorów mineralokortykoidowych^{50,56,69}. Dochodzi do tego za pośrednictwem zwiększonej ekspresji tkankowej TGF-β1, PAI-1, generacji wolnych rodników oraz zwiększenia ekspresji receptorów AT₁. Kompleks aldosteronu ze swoistym receptorem mineralokortykoidowym, poprzez czynnik jądrowy kappa B (NF-κB), ma aktywność czynnika transkrypcyjnego wyzwalającego ekspresję genów, skutkującą nasileniem produkcji międzykomórkowej cząstki adhezyjnej (ICAM-1), czynnika chemotaktycznego dla makrofagów i monocytów (MCP-1) oraz interleukiny 6 (IL-6)⁵⁵. Wysokie stężenia aldosteronu

mogą także zwiększać krzepliwość krwi, działać prozapalnie, wpływać na wzrost aktywności układu współczulnego oraz przyczyniać się do rozwoju hiperfiltracji kłębuszkowej⁷⁰.

Rola proreniny/reniny

Wyniki najnowszych badań zmieniły istotnie nasze postrzeganie roli reniny w układzie RAA i wskazują, aby traktować ją jako kolejny efektor tego układu. W badaniach *in vitro* wykazano, że renina i prorenina po połączeniu się z PRR aktywują nieangiotensynowy szlak sygnalizacyjny białek aktywowanych mitogenem (*MAP; ang. mitogen-activated protein*): kinazy regulowane pozakomórkowo 1/2 (ERK1 (p44) i ERK2 (p42) (*ang. extracellular signal-regulated kinase*) oraz p38 MAPK/Hsp27, w następstwie czego dochodzi do pobudzenia syntezy takich czynników profibrotycznych, jak *PAI-1*, *TGF-β1*, oraz dochodzi do zmiany w filamentach aktynowych kardiomiocytów^{9,56,71}. Konsekwencją tych procesów mogą być uszkodzenia narządowe, w tym nerek i serca, a efekt ten jest niezależny od Ang II oraz aldosteronu i może występować podczas stosowania inhibitorów konwertazy angiotensyny I (*IKA, ang. angiotensin-converting-enzyme inhibitor - ACEi*) lub ARA (*antagonistów receptorów AT₁ dla angiotensyny II - sartanów, ang. angiotensin II receptor antagonists*)^{56,72,73}. Sytuacja ta nabiera szczególnego znaczenia w przypadku cukrzycy, gdzie stwierdza się znacząco podwyższone stężenie proreniny⁷⁴. Niektóre badania wskazują, że wysoki poziom proreniny predysponuje do wystąpienia powikłań o typie mikroangiopatii oraz zwiększa ryzyko rozwoju cukrzycowej choroby nerek, co tłumaczy się między innymi aktywacją PRR⁹. Przeważa aktualnie pogląd, że prorenina nie indukuje bezpośrednio uszkodzeń narządowych, a raczej nasila niekorzystne oddziaływanie innych czynników, którymi mogą być wysokie stężenia glukozy czy też procesy zapalne^{72,73,75,76}. Potwierdzeniem tej teorii może być fakt, że nie obserwowano stwardnienia kłębuszków nerkowych u szczurów (*transgenic ren-2 rats*), u których wyidukowano 200-krotny wzrost stężenia proreniny⁹. Dane te mogą wskazywać, iż nie w każdej sytuacji może prorenina wykazywać działania niekorzystne, a w tych rozważaniach ważny również jest fakt, że PRR podlega mechanizmowi *down-regulation*, a czynnikiem zmniejszającym jego ekspresję jest właśnie prorenina.

Nefroprotekcja

Nefroprotekcja, czyli ochrona funkcji nerek, obejmuje trzy podstawowe działania mające na celu zmniejszenie ryzyka wystąpienia PChN czy też jej progresji⁷⁷:

- eliminację czynników ryzyka rozwoju PChN
- wczesną identyfikację pacjentów z PChN
- możliwie jak najwcześniejsze wdrożenie optymalnego postępowania terapeutycznego u chorych z rozpoznaną chorobą, mającego na celu skuteczne spowolnienie/zahamowanie postępu choroby

Stosując optymalne postępowanie nefroprotektoryjne, jesteśmy w stanie spowolnić postęp nefropatii o kilka lub nawet kilkanaście lat, zależnie od chwili rozpoczęcia takiego postępowania. Spowalniając zaś progresję PChN opóźnia się moment rozpoczęcia leczenia nerkozastępczego oraz zmniejsza ryzyko śmierci tych pacjentów z powodu powikłań sercowo-naczyniowych^{13,53,78,79}. Na każdym etapie choroby, a nawet przed jej wystąpieniem (profilaktyka pierwotna), postępowanie nefroprotektoryjne opiera się na modyfikacji stylu życia, szczególnie zapobieganiu nadwadze i otyłości, ograniczeniu spożycia sodu oraz zaprzestaniu palenia tytoniu^{3,7,53}. W farmakoterapii największą rolę ma skuteczna terapia nadciśnienia tętniczego oraz redukcja białkomoczu, oba te cele możliwe są do zrealizowania przy użyciu leków blokujących RAAs, co zostało dokładnie omówione w dalszej części rozdziału^{8,17,68,80}. Istotną rolę odgrywa też skuteczna farmakoterapia zaburzeń metabolicznych, takich jak zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej⁶.

Nefroprotekcja u chorych po przeszczepieniu nerki

U chorych po przeszczepieniu nerki, co zrozumiałe, nie jesteśmy w stanie prowadzić profilaktyki pierwotnej chorób nerek. Nie znaczy to jednak, że chorego z przeszczepioną nerką nie obowiązują powyżej przedstawione zasady profilaktyki (unikanie otyłości lub jej zwalczanie, zakaz palenia papierosów). Niezależnie od przyczyny powodującej schyłkową niewydolność nerek oraz stopnia uszkodzenia nerki przeszczepionej, wszystkie działania nefroprotektoryjne mają jeden cel terapeutyczny, czyli dążenie do jak najdłuższego funkcjonowania przeszczepionej nerki oraz poprawy przeżycia biorcy narządu^{3,20}. Podobnie jak w przypadku chorób nerek własnych, postępowanie nefroprotektoryjne obejmuje szereg działań nefarmakologicznych oraz postępowanie farmakologiczne^{4,22,78}. Możliwe działania nefroprotektoryjne wymieniono w tabeli 2. Szczególną uwagę należy poświęcić otyłości, do

której chorzy po przeszczepieniu narządu są predysponowani²⁰. Potwierdzono bowiem, że otyłość jest niezależnym czynnikiem ryzyka progresji przewlekłej choroby graftu m.in. poprzez zwiększenie aktywności RAA i układu współczulnego oraz wywoływanie insulinooporności. Udowodniono także silny niezależny wpływ zwiększonego wskaźnika BMI na wystąpienie zdarzeń sercowo-naczyniowych po przeszczepieniu nerki oraz krótszy czas przeżycia pacjentów i przeszczepów w tej grupie pacjentów⁸¹.

Tabela 2

Inne, poza hamowaniem układu RAA, możliwości postępowania nefroprotekcynowego u pacjentów z przewlekłą dysfunkcją nerki przeszczepionej^{6, 7, 26, 82}.

- Promowanie prozdrowotnego stylu życia:
 - ✓ Zaprzestanie palenia tytoniu
 - ✓ Regularna aktywność fizyczna, dostosowana do indywidualnych możliwości pacjenta
 - ✓ Racjonalnie skomponowana, zrównoważona i zdrowa dieta
 - ✓ Utrzymanie prawidłowej masy ciała; przeciwdziałanie nadwadze/otyłości
- Zwalczanie stresu i umiejętność pacjenta/bliskich radzenia sobie z chorobą
- Wczesne rozpoznanie i skuteczna korekcja czynników ryzyka usposabiających, inicjujących oraz przyspieszających rozwój IF/TA
- Ścisła eliminacja, zwłaszcza modyfikowalnych czynników ryzyka zaburzeń czynności przeszczepu, do których należą:
 - ✓ Regularne przyjmowanie leków immunosupresyjnych oraz innych zaleconych leków zależnie od wskazań (minimalizacja *non-adherence*)
 - ✓ Regularne wizyty kontrolne
 - ✓ Stałe monitorowanie funkcji przeszczepionej nerki
 - ✓ Monitorowanie poziomu leków immunosupresyjnych
 - ✓ W razie potrzeby wykrywanie oraz monitorowanie miana alloprzeciwciał specyficznych przeciwko antygenom HLA dawcy w surowicy krwi biorcy (DSA)
 - ✓ Terapia zakażeń
 - ✓ Szeroko pojęta profilaktyka przeciwnowotworowa
 - ✓ Całoroczna fotoprotekcja
 - ✓ Prewencja, ograniczanie i/lub terapia powikłań PDNP, wynikających z leczenia potransplantacyjnego czy związanych z postępującym upośledzeniem czynności graftu, zwłaszcza zaburzeń metabolicznych (szczególnie skupionych na prawidłowej kontroli stężenia glukozy oraz lipidów we krwi, aktywnym zapobieganiu niedokrwistości i/lub jej leczeniu)
 - ✓ Kontrola i utrzymanie prawidłowych wartości ciśnienia tętniczego krwi
 - ✓ Wykrywanie oraz efektywna redukcja białkomoczu

Leczenie nadciśnienia tętniczego

Odpowiednie leczenie nadciśnienia tętniczego jest jednym z ważniejszych czynników spowalniających postęp chorób nerek. Udowodniono, że nieprawidłowe ciśnienie tętnicze wpływa na szybszy postęp PChN, niezależnie od typu nefropatii leżącej u jej podstaw^{53,68}. Dotyczy to zarówno chorych z cukrzycową chorobą nerek, glomerulopatiami pierwotnymi, czy też z wielotorbielowatym zwyrodnieniem nerek. Według ostatnich zaleceń *KDIGO* (*ang. The Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) z 2012 roku, celem leczenia nadciśnienia tętniczego u większości chorych z PChN z albuminurią/białkomoczem jest uzyskanie ciśnienia tętniczego $\leq 130/80$ mmHg, chociaż zawsze podkreśla się konieczność indywidualizacji takiej terapii^{20,40,81,83}. Podobne są też rekomendacje *KDIGO* dotyczące populacji chorych po przeszczepieniu nerki, chociaż podlegają one krytyce z uwagi na to, że oparte są na opiniach ekspertów, a nie wynikają z CTRs (*ang. randomized controlled trials*)⁸⁴.

Jak wskazują duże randomizowane badania z grupą kontrolną (tabela 3), korzyści ze stosowania farmakologicznej blokady RAAs u chorych z PChN z białkomoczem przewyższają korzyści wynikające jedynie z obniżenia ciśnienia tętniczego uzyskanego przy stosowaniu innych grup leków^{85,86}. Efekt ten jest szczególnie widoczny u chorych z dużym białkomoczem, gdzie zwolnienie progresji niewydolności nerek jest najwyraźniejsze, wobec czego szczególnie w tej grupie chorych lekami hipotensyjnymi pierwszego wyboru są blokery RAAs, a więc IKA oraz ARA^{53,56,68,87}. Pamiętać należy, że nadciśnienie związane z chorobami nerek jest formą NT szczególnie opornego na farmakoterapię, wobec czego często konieczne jest leczenie kilkoma lekami hipotensyjnymi^{68,88,89,90}. Zalecane jest też w tej grupie chorych rozważenie zastosowania diuretyków, które zwiększają skuteczność farmakologicznej blokady RAAs, przyczyniając się do skuteczniejszego obniżenia ciśnienia tętniczego, a tym samym poprawiają efekt nefroprotektyny⁵⁰. Ponadto większość diuretyków zmniejsza ryzyko hiperkaliemii, która dość często utrudnia stosowanie leków blokujących RAAs w pełnych dawkach, zwłaszcza w przypadku upośledzonej funkcji nerek. Informacje dotyczące korzyści ze stosowania aliskirenu (DRI) u chorych po TN są stosunkowo nieliczne, ale należy się spodziewać, że efekt ten będzie podobny⁹¹.

Tabela 3

Badania kliniczne potwierdzające nefroprotektoryjne właściwości farmakologicznej blokady RAA [na podstawie^{7,52,65,68,87,92,93,94}].

Badanie	Populacja chorych biorących udział w badaniu	Zastosowane leki i ich główne efekty terapeutyczne
Collaborative Study Group 1993	CChN (n=409)	Kaptopril vs Placebo Terapia IKA wykazała 45% redukcję złożonego punktu końcowego*
AIPRI 1996	PChN o różnej etiologii (n=583)	Benazepril vs Placebo Terapia IKA wykazała 53% redukcję złożonego punktu końcowego*
REIN (GISEN Group) 1998	Nie-cukrzycowa PChN (n=117)	Ramipril vs Placebo Terapia IKA wykazała 52% redukcję złożonego punktu końcowego*
RENAAL 2001	CChN (n=1513)	Losartan vs Placebo Terapia ARA wykazała 16% redukcję złożonego punktu końcowego*
IDNT 2001	CChN (n=1715)	Irbesartan vs Placebo Irbesartan vs Amlodypina Terapia ARA wykazała 20% redukcję złożonego punktu końcowego* względem placebo oraz 23% jego redukcję w porównaniu do CCB
DETAIL 2002	CChN (n=272)	Enalapril vs Telmisartan Zarówno IKA, jak i ARA są jednakowo skuteczne, nie wykazując różnic w swoim działaniu nefroprotektoryjnym
ONTARGET 2008	Głównie CVD lub rzadziej CChN (n=25620)	Ramipril z Telmisartanem vs Ramipril vs Telmisartan Podwójna blokada osi RAA mniej korzystna niż monoterapia każdym z tych leków – w większym stopniu redukowała ciśnienie tętnicze i białkomocz, lecz to właśnie w tej grupie chorych osiągnięcie złożonego punktu końcowego* było najwyższe i częściej występowały działania niepożądane prowadzonego leczenia Terapia ARA była lepiej tolerowana niż terapia IKA, nie gorsza w analizie <i>non-inferior</i>

ALTITUDE 2012	Pacjenci z cukrzycą typu 2. z wysokim ryzykiem CVD i CChN (n=8606)	Aliskiren z IKA lub ARA vs Placebo z IKA lub ARA Dodanie DRI do standardowej terapii blokującej układ RAA (IKA lub ARA) nie przynosi korzyści w wybranej subpopulacji chorych, wiążąc się z większą częstością występowania zdarzeń niepożądanych (t.j. udar mózgu niezakończony zgonem, powikłania nerkowe, hiperkaliemia i hipotonia)
--------------------------	--	---

*Punkt końcowy: ryzyko wystąpienia schyłkowej niewydolności nerek (konieczność leczenia nerkozastępczego), podwojenie stężenia kreatyniny lub zmniejszenie o połowę wyjściowego klirensu kreatyniny, zgon
Akronimy oraz pełne nazwy w/w badań załączono w *Aneksie*.

Białkomocz

Jak już wspomniano powyżej, bardzo ważnym elementem farmakoterapii chorych z PChN jest obniżenie białkomoczu do możliwie jak najniższych wartości. Wykazano bowiem, że białkomocz jest niezależnym od wielkości systemowego ciśnienia tętniczego czynnikiem indukującym zmiany w obrębie kłębuszków oraz śródmiąższu nerek, tym samym przyspieszającym postęp choroby nerek^{95, 96, 97}. Udowodniono, że albuminuria/białkomocz, są istotnymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (CVD), prowadząc do zwiększonej śmiertelności u chorych z cukrzycową chorobą nerek i/lub upośledzoną funkcją nerek^{98,99,100,101,102}. Analiza wyników badania *Modification of Diet in Renal Disease Study (MDRD)* wykazała, że obecność i nasilenie białkomoczu jest czynnikiem, który znacznie uwrażliwia nerki na niekorzystny wpływ wysokiego ciśnienia tętniczego krwi⁵³. Badanie to potwierdziło, że stopień nasilenia białkomoczu jest ściśle związany z szybkością rocznego tempa zmniejszania się GFR. Z kolei ciśnienie tętnicze jest jedną z głównych zmiennych, od której zależy nasilenie białkomoczu, stąd tak kluczowe jest jednoczesowe obniżanie ciśnienia tętniczego i białkomoczu.

Ocenia się, że białkomocz występuje od 7,5% do nawet 45% pacjentów po TN (średnio u 1/3 chorych)¹⁰³. Pamiętać należy, że nawet niewielki białkomocz w tej grupie chorych niesie poważne implikacje kliniczne, ponieważ stanowi on niekorzystny czynnik rokowniczy przeżycia graftu i istotnie przyspiesza progresję nefropatii^{101,104,105}. Wyniki badań wskazują, że białkomocz poniżej 500 mg/dobę związany jest z 4-krotnym zwiększeniem ryzyka niewydolności przeszczepu, natomiast w przypadku biorców z białkomoczem

nerczycowym ryzyko to zwiększa się 19-krotnie w porównaniu do pacjentów bez białkomoczu^{43,100}. Halimi J.M. i wsp. w swoim badaniu wykazali w kohorcie 484 biorców, iż obniżenie proteinurii tylko o 100 mg/dobę skutkowało 12% zmniejszeniem ryzyka utraty graftu podczas średniego okresu obserwacji 7,2 lat¹⁰⁶. Natomiast Sancho A. i wsp. analizowali dane 337 chorych z utrwalonym białkomoczem powyżej 0,5 g/dobę utrzymującym się pomimo leczenia NT (20,2 % pacjentów biorących udział w badaniu)¹⁰⁷. Potransplantacyjny białkomocz związany był z nadwagą (BMI > 25 kg/m²), obecnością alloprzeciwciał klasy HLA przed przeszczepieniem, opóźnioną funkcją graftu (DGF) oraz leczeniem takrolimusem (TAC). U chorych z białkomoczem obserwowano od wczesnych etapów po TN podwyższone stężenie kreatyniny w surowicy oraz wyższe skurczowe ciśnienie tętnicze krwi (SBP). Badacze wykazali, że 3- i 5-letnie przeżycie przeszczepu u chorych z białkomoczem było krótsze (69 vs 96% u chorych bez białkomoczu). Wyniki badania Fernández-Fresnedo G. i wsp. przeprowadzonego w grupie 532 chorych po przeszczepieniu nerki od dawcy zmarłego (36,4% z nich miało utrwalony białkomocz) wykazało, że w perspektywie 5-cio i 10-letniej obserwacji, w grupie biorców z białkomoczem przeżycie przeszczepu było istotnie niższe jak w grupie bez białkomoczu (odpowiednio: 60% i 25% vs 90% i 80%), a przyczyną utraty nerki w 64% przypadków była przewlekła dysfunkcja graftu¹⁰⁰. Również pięcio- i dziesięcioletnie przeżycie pacjentów było gorsze wśród chorych z białkomoczem (odpowiednio 85% i 60%) aniżeli pacjentów bez białkomoczu (90% i 83%). Inne badania również wskazują, że ryzyko zgonu chorego z czynnym przeszczepem jest wyraźnie wyższe u chorych z białkomoczem w porównaniu z chorymi, u których białkomoczu nie stwierdzano^{81,100}. Dowiedziono, iż wzrost proteinurii o każdy 1 g/dobę powoduje 16% wzrost ryzyka śmiertelności pacjenta^{43,101}. Badania te wskazują, że białkomocz u biorców nerek jest być może istotniejszym czynnikiem ryzyka aniżeli u chorych bez TN^{42,103}. Zatem większy efekt nefroprotektoryjny można uzyskać zmniejszając skutecznie wydalanie albuminy/białka z moczem aniżeli jedynie obniżając ciśnienie tętnicze, stąd ważnym celem terapeutycznym u chorych po przeszczepieniu nerki jest redukcja proteinurii do możliwie jak najmniejszych wartości. Oczywiście jest, konieczność realizowanie w praktyce klinicznej obu tych celów jednocześnie i od wielu lat realizację tego założenia osiąga się przez użycie leków blokujących RAAs^{56,59,60,108,109}. Ponadto ilość białka uwalnianego z moczem jest bezpośrednim wykładnikiem stopnia aktywacji osi RAA w nerkach i jest to również dobry wskaźnik oceniający skuteczność leczenia nerkoochronnego⁵².

Inne strategie postępowania nefroprotekcijnego, poza dokładnie omówionym poniżej hamowaniem układu RAA, przedstawiono w tabeli 2.

1.2. Farmakologiczna blokada RAA jako podstawowe założenie nefroprotekcji

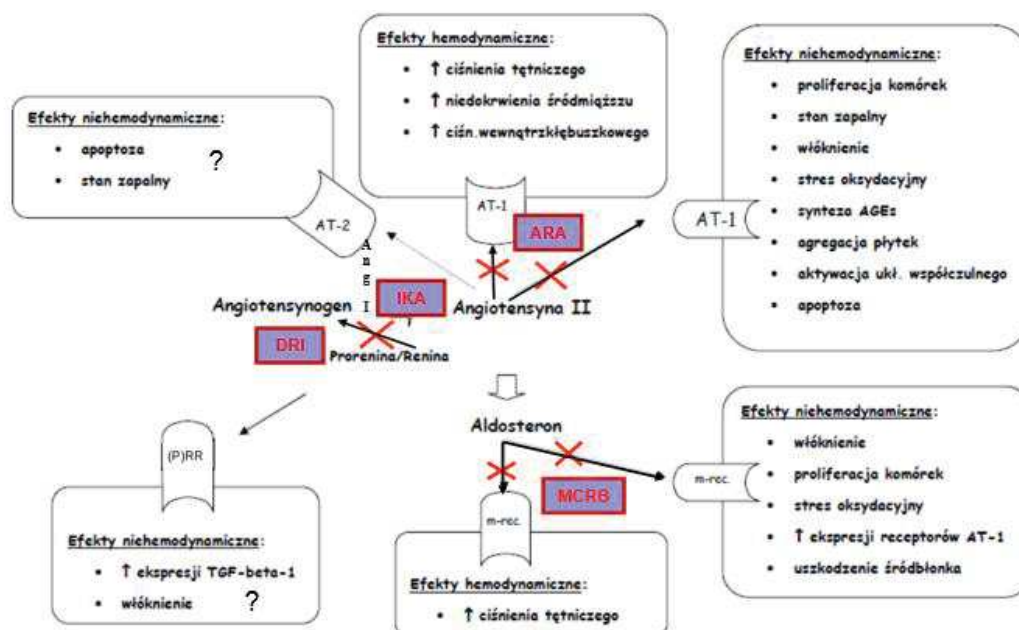
Farmakologiczna blokada układu RAA stała się podstawą leczenia chorób nerek oraz układu krążenia. Tak ważna rola leków hamujących układ RAA wynika zarówno ze skutecznego obniżania ciśnienia tętniczego, zmniejszania białkomoczu oraz ograniczania szeregu niekorzystnych niehemodynamicznych efektów działania angiotensyny II i aldosteronu^{7,52,110}.

W chwili obecnej w powszechnym użyciu w Polsce są 2 grupy leków ograniczające niekorzystne efekty nadmiernej aktywacji układu RAA tj. inhibitory konwertazy angiotensyny I (IKA) oraz antagoniści receptora AT₁ dla angiotensyny II (sartany, ARA). Leki te, działając poprzez odmienne punkty uchwytu, efektywnie „ingerują” w mechanizmy leżące u podłoża progresji przewlekłych nefropatii^{9,50,109,111,112}. Pierwsza grupa leków swoje działanie wywiera wskutek hamowania aktywności konwertazy angiotensyny – podstawowego enzymu kaskady układu RAA, natomiast ARA blokują pobudzenie receptora AT₁ przez angiotensynę II^{68,93,113}. Wskutek tej blokady zmniejsza się synteza głównego efektora biologicznego układu RAA – angiotensyny II. Miejsce działania leków blokujących RAA oraz ich potencjalny wpływ na układ RAA prezentuje rycina 3.

Najnowszym lekiem blokującym układ RAA jest jedyny jak dotąd przedstawiciel grupy bezpośrednich inhibitorów reniny – aliskiren. Lek ten został zarejestrowany przez FDA (*ang. Food and Drug Administration; Agencję do Spraw Żywności i Leków w Stanach Zjednoczonych*) w leczeniu nadciśnienia tętniczego w 2006 roku, a w 2008 został dopuszczony do obrotu na terenie Unii Europejskiej. Działanie DRI opiera się na podobieństwie budowy do fragmentu angiotensynogenu (miejsce wiązania reniny) i blokowaniu w ten sposób aktywności tego enzymu. Aliskiren stosowany w rekomendowanej dawce dobowej 150 i 300 mg obniża ciśnienie tętnicze krwi w stopniu zbliżonym do IKA, ARA, blokerów kanału wapniowego i diuretyków^{2,74,77}. Wyniki badań eksperymentalnych oraz wstępne badania kliniczne przeprowadzone w populacji chorych z cukrzycową chorobą nerek wskazują, że lek ten może być uzupełnieniem, a czasami alternatywą, stosowanej dotychczas farmakologicznej blokady układu RAA^{7,114}. Dotychczasowe badania u chorych z PChN były prowadzone na stosunkowo małych grupach chorych przez krótki czas. Istnieją również

nieliczne badania wskazujące na skuteczność tego leku w redukcji białkomoczu u chorych z nefropatiami nie-cukrzycowymi^{7, 88, 108, 115}.

Nefroprotecyjne działanie leków blokujących RAAs wynika z hamowania jego aktywności na różnych poziomach, co powoduje ograniczenie niekorzystnych efektów hemodynamicznych i niehemodynamicznych pobudzenia RAAs (rycina 3). Najważniejsze badania kliniczne potwierdzające ich właściwości nefroprotecyjne zawarto w tabeli 3. Jak wcześniej wspomniano, większość z nich wskazuje, że leki te w obserwacjach długoterminowych prowadzonych na dużych grupach chorych spowalniają postęp PChN. Korzystny efekt jest szczególnie widoczny u chorych z dużym białkomoczem i jest zależny od stopnia jego redukcji^{7,106}. Badania porównujące IKA lub ARA z innymi lekami hipotensyjnymi, wykazały, że ich skuteczność jest zależna nie tylko od stopnia redukcji ciśnienia tętniczego^{7,106,116}. Działanie nefroprotecyjne IKA widoczne jest w każdym stadium PChN, co wykazano między innymi w badaniach Hou F.F. i wsp. oraz retrospektywnej analizie badania REIN^{7,42,43,52}. W badaniach AIPRI i REIN, wykazano, że zastosowanie terapii IKA u pacjentów z eGFR w przedziale 30–60 ml/min umożliwia opóźnienie momentu rozpoczęcia leczenia nerkozastępczego o około 3–4 lata^{7,52}. Właściwości nefroprotecyjne ARA wykazano u chorych z cukrzycową chorobą nerek (RENAAL, IDNT czy IRMA-2)^{52,85,117}. Wykazano, że opóźniają lub hamują wystąpienie albuminurii, jej progresję w kierunku białkomoczu jawnego, spowalniają tempo spadku filtracji kłębuszkowej oraz moment rozpoczęcia leczenia nerkozastępczego^{7,52}. Najlepsze efekty uzyskiwano, podobnie jak w terapii prowadzonej w oparciu o IKA, u chorych z wyższym białkomoczem.



Legenda: AT-1 i AT-2, receptory dla angiotensyny II; m-rec., receptor mineralokortykoidowy; PRR, receptor dla (pro)reniny; DRI, bezpośredni inhibitor reniny; ARA, antagonisty receptorów AT₁ dla angiotensyny II; IKA, inhibitor konwertazy angiotensyny I; MCRB, bloker receptora mineralokortykoidowego; TGF-β-1, transformujący czynnik wzrostu β-1; AGEs, końcowe produkty zaawansowanej glikacji białek; Ang I, angiotensyna I

Rycina 3. Wpływ angiotensyny II, aldosteronu, proreniny i reniny na uszkodzenie nerek oraz punkty uchwytu leków blokujących układ RAA (na podstawie Tylicki L.: Optymalizacja leczenia nefroprotekcijnego przy pomocy farmakologicznej blokady układu renina-angiotensyna-aldosteron: Rozprawa habilitacyjna. Gdańsk, 2006, s. 7; w modyfikacji własnej).

Zagrożenia ze stosowania blokady układu RAA

Mimo wielu korzystnych efektów terapii lekami z grupy inhibitorów RAA obserwowanych u chorych z PChN, niesie ona ze sobą także możliwość wystąpienia istotnych działań niepożądanych. Zagrożenia dotyczą wszystkich grup obecnie stosowanych leków blokujących RAAs na różnych poziomach, tj. IKA, ARA, DRI, jak również MCRB (*bloker receptora mineralokortykoidowego; ang. mineralocorticoid receptor blocker*)^{56,60,63,68,118,119,120,121}.

Do najczęściej występujących działań niepożądanych leków blokujących RAAs należą:

- hipotensja (ryzyko jej wzrasta w przypadku chorych odwodnionych)
- hiperkaliemia
- zmniejszenie filtracji kłębuszkowej, zwłaszcza w początkowym okresie terapii
- niedokrwistość, szczególnie w przypadku stosowania IKA

Bezpieczeństwo terapii blokerami RAAs wymaga, aby unikać ich stosowania w przypadku stwierdzanych przeciwwskazań, a niektóre z nich w szczególności dotyczą chorych po TN, a jest to m.in. zwężenie tętnicy nerki przeszczepionej. Ponadto należy zachować ostrożność u chorych ze zmniejszoną objętością wewnątrznaczyniową, skutkującą

hipoperfuzją w obrębie przedkłębuszkowego łożyska naczyniowego oraz w przypadku równoczesnego przyjmowania przez chorego niesteroidowych leków przeciwzapalnych^{53,78,109}. Pamiętać także należy, że na pogorszenie czynności nerki oraz wystąpienie groźnej dla życia hiperkalemii mogą też mieć wpływ stosowane leki immunosupresyjne z grupy CNI^{20,57,122}. Stosowanie blokady RAAs wbrew przeciwwskazaniom zawartym w charakterystyce produktu leczniczego może predysponować do ostrego uszkodzenia nerek (*ang. acute kidney injury; AKI*), a czasami nawet stałej i nieodwracalnej ich niewydolności.

Zmniejszenie ryzyka terapii blokerami RAAs u chorych po przeszczepieniu nerki, wymaga szczególnie ostrożnego postępowania przy rozpoczynaniu stosowania tych leków i przestrzeganie pewnych zasad, a mianowicie^{68,87,109}:

- rozpoczynania terapii od małych dawek dostosowanych do aktualnej funkcji nerki
- kontrola stężenia kreatyniny i potasu w surowicy w krótkim okresie po rozpoczęciu terapii (np. 7-10 dni)
- w późniejszym okresie terapii okresowe monitorowanie stężenia hemoglobiny, potasu i Scr/eGFR, zwłaszcza w przypadku pacjentów z umiarkowaną lub ciężką niewydolnością nerek
- regularne kontrolowanie ciśnienia tętniczego krwi

Rola blokady układu renina–angiotensyna–aldosteron jako potencjalnej opcji terapeutycznej w postępowaniu nefroprotekcyjnym chorych z PDNP

Wpływ leków blokujących RAAs na albuminurię/białkomocz

Redukcja białkomoczu jest ważnym czynnikiem mającym na celu zmniejszenie ubytku filtracji kłębuszkowej poprzez ograniczenie procesów twardnienia kłębuszków, włóknienia śródmiaższu nerki oraz zaniku cewek w nerce przeszczepionej (IF/TA)^{3,99,103,104}. Jak wcześniej przedstawiono farmakologiczna blokada układu RAA pozostaje najlepiej udowodnioną metodą leczenia obniżającego białkomocz^{56,87,93}. Inhibitory układu RAA wykazują przewagę nad innymi grupami leków hipotensyjnych w chorobach nerek własnych, jak również po przeszczepieniu nerki^{123,124,125}.

Dowodem na korzystne efekty blokady RAAs po przeszczepieniu nerki może być badanie przeprowadzone na doświadczalnym modelu szczurzym, gdzie od dawców rasy Fisher F 344 przeszczepiono nerki biorcom rasy Lewis^{126,127} i zastosowano ARA (kandesartan) w dawce 5

mg/kg m.c./d. oraz cyklosporynę A (1,5 mg/kg m.c./d. do 10. dnia po transplantacji). Terapię kandesartanem prowadzono do 24 tygodnia po TN i wykazano, iż może ona znacząco przyczyniać się do hamowania uszkodzenia przeszczepionej nerki. Wyniki tego badania mogą wskazywać, że ARA zmniejsza nie tylko białkomocz, ale i stopień zaawansowania przewlekłej nefropatii graftu, poprzez zmniejszenie apoptozy komórek cewek nerkowych. Ponadto obserwowano mniejsze nasilenie niekorzystnych zmian morfologicznych w obrazie histopatologicznym bioptatu nerki, gdzie stwierdzano znacząco niższy odsetek stwardniałych kłębuszków nerkowych oraz mniejszą liczbę komórek zapalnych naciekających przeszczepiony narząd.

Wpływ leków blokujących RAAs na kontrolę ciśnienia tętniczego

Należy mieć na uwadze fakt, iż niektóre z „tradycyjnych” czynników uszkadzających nerki w przypadku pacjentów z przeszczepioną nerką występują ze zwiększoną częstością i nasileniem, co dotyczy nadciśnienia tętniczego (NT)³. Szacuje się, że częstość występowania NT u pacjentów po przeszczepieniu nerki wynosi od 60 do 95%^{81,109,128}. Etiopatogeneza NT wśród biorców przeszczepu nerkowego jest wieloczynnikowa i złożona, co zostało przedstawione w tabeli 4^{28,59,81,129}. Jak ważna jest rola NT u chorych po przeszczepieniu nerki może wskazywać fakt, że NT występujące przed przeszczepieniem jest istotnym czynnikiem ryzyka późniejszego przewlekłego upośledzenia funkcji graftu³. Retting i wsp. w badaniach na szczurach z genetycznie uwarunkowanym NT udowodnił, że może ono zostać przeniesione od dawcy do biorcy przeszczepu¹³⁰. Co więcej, dowiedziono, iż przeszczepienie nerki od dawcy z prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi chorym z nefropatią nadciśnieniową (NN) powodowało normalizację ciśnienia i w efekcie uzyskanie ustąpienia NT u biorcy nerki²⁸. Nie dziwi więc zatem, że jedną z podstaw skutecznej terapii nefroprotektoryjnej jest dobra kontrola ciśnienia tętniczego krwi^{3,13}. Opelz G. i wsp. potwierdzili, że istnieje odwrotna zależność pomiędzy wartościami ciśnienia tętniczego, a przeżyciem graftu¹¹⁸. Dodatkowo, w obserwacji 6-letniej, ci sami badacze wykazali, iż najlepszym czynnikiem prognostycznym jest skurczowe ciśnienie tętnicze krwi (SBP)⁵³. Wobec złożoności patogenezy NT, nefarmakologiczne sposoby postępowania u biorców nerek nie są zwykle tak skuteczne jak w populacji ogólnej, stąd istotną rolę odgrywa leczenie farmakologiczne, w tym blokada RAAs^{56,59,131}. Wiadomo, że leczenie NT przy współistniejącej chorobie nerek, z użyciem farmakologicznej blokady RAAs równocześnie obniża ciśnienie tętnicze, jak również działa

nefroprotekcynie niezależnie od stopnia redukcji ciśnienia⁵⁶. Stąd też, jako leki hipotensyjne pierwszego wyboru u pacjentów po przeszczepieniu nerki z białkomoczem powinny być rozważane leki hamujące RAAs^{28,40}.

Tabela 4

Najczęstsze przyczyny nadciśnienia tętniczego u chorych po KT_x

<u>Czynniki związane z chorobą nerek własnych</u> • NT przetrwałe z okresu przed TN • Czas trwania PChN i okresu dializoterapii (związane m.in. z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego, sztywnością naczyń i ich zwapnieniem) • Wysokie stężenia reniny (<u>hiperreninemia</u>) • Zwiększona retencja soli i płynów (w efekcie m.in. wzrostu aktywności układu RAA) <u>Czynniki związane z przeszczepieniem nerki</u> • Opóźniona czynność przeszczepionej nerki (DGF) • Działanie leków immunosupresyjnych, głównie inhibitorów kalcyneuryny (CNI) zwłaszcza <u>cyklosporyny A</u>, a także kortykosteroidów (efekt zależny od dawki) • Czynniki uszkodzające <u>graft</u> (w tym m.in. ostre i przewlekłe odrzucanie przeszczepu, ostra martwica cewek nerkowych) • Powikłania urologiczne np. <u>limfocele</u>, zwężenie moczowodu i/lub zaburzenia naczyniowe graftu np. zwężenie tętnicy nerki przeszczepionej • <u>Nadkrwistość potransplantacyjna</u> • Czynniki zależne od dawcy nerki (np. obecność NT, śmierć pnia mózgu) • Czynniki zależne od biorcy narządu (np. otyłość, zespół metaboliczny, cukrzyca <u>potransplantacyjna</u>, profil genetyczny, rasa)

Wpływ leków blokujących układ RAA na układ sercowo–naczyniowy (CVD)

Choroby układu sercowo-naczyniowego (CVD) są wiodącą przyczyną zachorowalności i umieralności wśród pacjentów po TN, co wpływa istotnie na wyniki przeszczepiania nerek^{22,29,81}. Istnieją liczne dowody oparte na badaniach przeprowadzonych na dużych kohortach pacjentów ze schorzeniami układu sercowo-naczyniowego, że stosowanie inhibitorów układu RAA zmniejsza ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych w populacji ogólnej, wśród pacjentów z przewlekłymi chorobami nerek, w tym także wśród chorych po TN^{13,116,132,133}. Mając na uwadze powyższe aspekty, nie dziwi fakt, iż leki

hamujące układ RAA odgrywają ważną rolę we współczesnej farmakoterapii CVD i mają uznaną pozycję w wytycznych i standardach międzynarodowych towarzystw kardiologicznych^{53,54,56,67}. Badania populacji osób po TN także potwierdzają powiązanie zaawansowania niewydolności nerki przeszczepionej z rozwojem powikłań sercowo-naczyniowych, a tym samym wpływu chorób układu krążenia na przeżycie nerki przeszczepionej^{29,81,100,128}. Zrozumiałe jest zatem, że stosowanie blokady RAA, u chorych z CVD może być formą pośredniej nefroprotekcji u chorych po przeszczepieniu narządów, powodując wydłużenie przeżycie graftu i chorych⁷.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że większość czynników ryzyka rozwoju i progresji chorób nerek, szczególnie albuminuria/białkomocz i/lub upośledzenie filtracji kłębuszkowej, są niezależnymi czynnikami ryzyka CVD^{53,134,135}. Podobnie jak w PChN własnych, przewlekłemu uszkodzeniu nerki przeszczepionej często towarzyszą powikłania kardiologiczne, w których udział ma nadmierna aktywacja osi RAA^{51,56}. Według oceny grupy *NKF-K/DOQI* (*The National Kidney Foundation – Kidney Disease/Dialysis Outcomes Quality Initiative*) kontrola nad rozwojem CVD może bardziej przyczynić się do długoterminowego przeżycia przeszczepionej nerki, aniżeli wprowadzanie nowych leków immunosupresyjnych^{22,53}. Stanowi to kolejny argument przemawiający za szerszym stosowaniem leków blokujących RAA w tej grupie pacjentów^{52,67}.

Optymalizacja farmakologicznej blokady osi RAA u chorych po przeszczepieniu nerki

Zalecenia *NKF-K/DOQI* wskazują, że włączenie inhibitora RAA (dotychczasowe zalecenia dotyczą IKA i ARA) powinno być postępowaniem pierwszego wyboru u wszystkich pacjentów z PChN i towarzyszącym białkomoczem⁴⁰, zwłaszcza u chorych z NT, jeśli nie stwierdza się przeciwwskazań do takiego typu leczenia. Podobne w tym zakresie są zalecenia kardiologiczne *ESH/ESC* (*European Society of Hypertension/European Society of Cardiology*), które zalecają zastosowanie leku z grupy blokerów układu RAA u chorych z subklinicznymi uszkodzeniami narządowymi, w tym uszkodzeniem nerek wyznaczanym obecnością albuminurii i/lub upośledzeniem filtracji kłębuszkowej¹³⁶.

Leki z grupy inhibitorów RAA, obok blokerów kanału wapniowego (CCB) i diuretyków, uznane są za leki pierwszego rzutu w leczeniu NT^{20,22,30,128,131}. Zalecenia dotyczące tego zagadnienia u chorych po TN nie są jednak tak jednoznaczne. Zgodnie z ostatnimi

rekomendacjami *KDIGO* (ang. *The Kidney Disease: Improving Global Outcomes*), a także ze stanowiskiem grupy ekspertów *ERBP* (*European Renal Best Practice*), zasadne jest rozważenie farmakologicznej blokady RAAs u pacjentów po TN z istotnymi wskazaniami klinicznymi, jeśli nie ma przeciwwskazań do takiego leczenia¹³⁷. Według *KDIGO* za wskazania do włączenia leków blokujących RAAs uznaje się nadciśnienie tętnicze, białkomocz i nadkrwistość związaną z przeszczepieniem²⁰.

Retrospektywna analiza uwzględniająca lata 1990-2003 z udziałem 2031 pacjentów po pierwszej TN, wykazała, że długotrwałe leczenie IKA lub ARA spowodowało zdecydowanie lepsze długoterminowe wyniki po transplantacji (przeżycie pacjentów w 10-letniej obserwacji w grupie chorych otrzymujących blokadę RAAs 74% vs 53% u nieleczonych tym sposobem)¹¹⁶. Obserwowana różnica przeżycia wynikała głównie z ograniczenia śmiertelności z przyczyn CVD. Poza poprawą przeżycia pacjentów, odnotowano również 30% wzrost przeżycia graftu w obserwacji pięcioletniej. Wyniki retrospektywnej analizy Lin J. i wsp. dowodzą skuteczności zastosowania blokady RAAs również w późniejszym okresie po przeszczepieniu nerki. W badaniu tym w grupie 63 pacjentów ze zdiagnozowaną w biopsji przewlekłą nefropatią przeszczepu (CAN, według ówczesnego mianownictwa) porównano wpływ leczenia IKA lub ARA w stosunku do innych schematów terapeutycznych, na progresję przewlekłego uszkodzenia nerki przeszczepionej¹³⁸. Leczenie inhibitorami układu RAA powodowało spowolnienie postępu niewydolności przeszczepu. Pierwszorzędowy punkt końcowy, którym był ponad 50% wzrost Scr osiągnęło 19% chorych leczonych vs 39% z grupy kontrolnej. Obserwowano również, że znamienne mniej pacjentów z grupy leczonej blokerami układu RAA osiągnęło drugorzędowy złożony punkt końcowy, obejmujący śmierć chorego lub schyłkową niewydolność przeszczepu (odpowiednio: 9,4% vs 35,5%; $p=0,01$).

Istotne jest zatem, aby odpowiednio dobrane do każdego chorego leczenie immunosupresyjne (indywidualizacja terapii), uzupełnić próbą leczenia nefroprotektynego przy użyciu leków blokujących RAAs u odpowiednio dobranych chorych, za których uznaje się:^{57,59,81,86,124,139,140,141}

- chorych z wczesnymi objawami PDNP, ze stabilną funkcją graftu (za bezpieczne uznaje się stężenie kreatyniny w surowicy krwi poniżej 2,5 mg/dl) oraz stężeniem potasu w granicach normy

- chorych z towarzyszącym białkomoczem powyżej 1 g/d. w przypadku biorców dorosłych lub $\geq 600 \text{ mg/m}^2/\text{d.}$ w przypadku pacjentów $< 18.$ r.ż.
- chorych z NT bez przeciwwskazań do terapii IKA/ARA
- chorych z współistniejącą cukrzycą
- chorych z nadkrwistością potransplantacyjną
- chorych ze współistniejącą chorobą serca, zwłaszcza jego niewydolnością oraz po zawałach mięśnia sercowego
- biorców z wysokim ryzykiem rozwoju miażdżycy

Jednocześnie należy zaznaczyć, że nie ma jak dotąd wystarczających dowodów, aby polecić terapię z udziałem blokerów osi RAA we wczesnym okresie potransplantacyjnym. W tym okresie, potencjalne niekorzystne działania tej grupy leków, dodatkowo potęgowane przez CNI, mogą być trudne do różnicowania z innymi stanami mogącymi powodować podobne zaburzenia (np. opóźnioną funkcją graftu, ostrym odrzucaniem nerki przeszczepionej)^{31,109,131,141}. Dlatego też większość autorów proponuje rozważenie IKA/ARA po 6-12 miesiącach od przeszczepienia. Postawę taką wydaje się również potwierdzać retrospektywne badanie Opelza i wsp., gdzie wykazano, iż terapia taka nie przynosi korzyści, jeśli jest stosowana w pierwszym roku po TN¹⁴². Odmienne są wyniki innego retrospektywnego badania obejmującego 436 pacjentów, u których wystąpiła opóźniona czynność przeszczepu (DGF), które wskazują, że wczesne zastosowanie blokerów osi RAA może zapewnić dodatkowe korzyści pacjentom w aspekcie długoterminowym. Po włączeniu IKA lub ARA już w okresie okołotransplantacyjnym uzyskano istotnie lepsze 10-letnie przeżycie przeszczepionej nerki aniżeli u chorych stosujących inne leki hipotensyjne (44% vs 32%; $p=0,002$)¹⁴¹.

Innym ograniczeniem stosowania IKA/ARA we wczesnym okresie potransplantacyjnym może być niedokrwistość, którą stwierdza się u 45-72% pacjentów w okresie pierwszych kilku miesięcy po zabiegu (niedokrwistość potransplantacyjna wczesna)^{31,143}. Także między innymi dlatego część autorów terapię z udziałem tych leków zaleca po upływie 6 miesięcy od TN^{30,53}. Tak więc, w praktyce klinicznej wobec stosowania farmakologicznej blokady układu RAA obserwuje się dwie postawy lekarzy prowadzących pacjentów po TN. Pierwsza z nich zakłada, że stosowanie leków z tej grupy preferowane jest dopiero, gdy pacjenci rozwinęli białkomocz i stwierdza się progresję IF/TA. Natomiast druga opcja, w której podkreśla się pleiotropowe właściwości omawianych grup leków, zakłada, iż

w celu wykorzystania ich działania narządowo-ochronnego (nefroprotekcji oraz kardioprotekcji) należy je włączyć możliwie wcześnie po transplantacji, u możliwie dużego odsetka pacjentów po przeszczepieniu¹²³.

Odrębną kwestią pozostaje dawkowanie leków z grupy IKA i ARA w celu wykorzystania ich działania nefroprotekcijnego przy ograniczeniu działań niepożądanych. Działanie nefroprotekcyjne inhibitorów RAAs jest proporcjonalne do zastosowanej dawki, stąd uzyskane efekty są tym lepsze, im wyższa dawka zastosowanego leku^{6,115,144}. Mając na uwadze optymalne nefroprotekcyjne dawkowanie tych leków, chorym z PChN własnych zaleca się stosowanie maksymalnie rekomendowanych dawek terapeutycznych, przy założeniu stopniowego zwiększania dawki^{53,68}. Na chwilę obecną nie wypracowano jednolitych zasad dawkowania blokerów RAAs u biorców alloprzeszczepu nerkowego, stąd najbardziej racjonalnym wyborem jest indywidualizacja i optymalizacja tego typu terapii na każdym etapie po przeszczepieniu^{3,109}.

Podsumowując, w przeciwieństwie do pacjentów z PChN własnych, w przypadku pacjentów po TN nie ma jasnych rekomendacji odnośnie czasu włączenia farmakologicznej blokady RAAs, ani dawek stosowanych leków. Wydaje się, że zasady leczenia IKA lub ARA powinny być podobne jak w przypadku PChN, jednak konieczne są dowody oparte na długoterminowych badaniach przeprowadzonych na dużej kohorcie pacjentów. Odrębną też sprawą pozostaje poszukiwanie nowych metod farmakologicznej nefroprotekcji, przy użyciu blokady na innych poziomach RAAs, aniżeli ma to miejsce przy użyciu IKA/ARA^{34,145,146}.

Poszukiwanie nowych metod leczenia nefroprotekcijnego u chorych po przeszczepieniu nerki – rola aliskirenu

Jak wcześniej wspomniano, od 2006 roku mamy w praktyce klinicznej do dyspozycji nowy lek blokujący układ RAA - aliskiren. Efektywność tego leku w redukcji ciśnienia tętniczego jest wyraźnie udokumentowana i uznana^{9,75}. Dotychczas opublikowane badania wskazują na podobne efekty działania aliskirenu w zakresie działania nefroprotekcijnego. Należy jednak podkreślić, że liczba opublikowanych badań dotyczących tego zagadnienia jest niewielka oraz obejmuje mniejsze liczby chorych z krótszym okresem obserwacji aniżeli w przypadku pozostałych leków blokujących RAAs¹¹⁵.

Wyniki dotychczasowych badań eksperymentalnych wskazują, iż aliskiren może wykazywać działanie przeciwdziałające uszkodzeniom narządowym. W badaniach na szczurach wykazano, iż lek ten ma działanie przeciwzapalne, co objawiało się zmniejszeniem nacieków z makrofagów, limfocytów CD4 i CD8 oraz komórek dendrytycznych w obrębie nerek. Stwierdzono również, iż aliskiren zmniejsza zapalenie w obrębie dużych naczyń u myszy, a efekt ten jest niezależny od redukcji ciśnienia tętniczego. Aliskiren przeciwdziałał również tworzeniu się zmian miażdżycowych stymulowanych dietą wysokocholesterolową i poprawiał funkcję śródbłonna. Wyniki badań eksperymentalnych wskazują, że aliskiren może działać nefroprotekcynie zarówno w cukrzycowych, jak i nie-cukrzycowych modelach PChN⁴. W badaniach na szczurach podwójnie transgenicznym (model dTGR) porównano ARA (walsartan) z DRI w ograniczeniu następstw NT⁹. Aliskiren zarówno w wysokiej, jak i niskiej dawce powodował obniżenie ciśnienia tętniczego, normalizację stężenia kreatyniny, spadek albuminurii, regresję przerostu lewej komory serca oraz w konsekwencji wydłużenie czasu przeżycia leczonych zwierząt. W badaniu przeprowadzonym na szczurach z nefropatią cukrzycową obniżał albuminurię porównywalnie z perindoprilem (inhibitorem ACE), pomimo istotnie mniejszej redukcji ciśnienia tętniczego^{9,115}.

W jednym z pierwszych badań klinicznych u chorych z białkomoczem i NT wykazano, że zastosowanie aliskirenu u chorych z cukrzycą typu 2, spowodowało znaczne obniżenie UACR¹⁴⁷. Natomiast w największym jak do tej pory opublikowanym badaniu *AVOID (Aliskiren in the Evaluation of Proteinuria in Diabetes)* Parving i wsp. badali u 599 chorych wpływ dołączenia aliskirenu lub placebo do stosowanego uprzednio losartanu w pełnej zalecanej dawce z nefropatią cukrzycową¹¹⁴. W badaniu tym wykazano, że zastosowanie aliskirenu w dawce 300 mg/dobę powoduje 20-procentową redukcję albuminurii w porównaniu z efektem placebo ($p=0,002$), a co więcej u ponad 24% chorych leczonych aliskirenem redukcja albuminurii przekroczyła 50%. Tempo spadku filtracji kłębuszkowej było podobne w obu grupach. Terapia aliskirenem była dobrze tolerowana, jedynie liczba incydentów hiperkalemii powyżej 6 mmol/L była większa w porównaniu z grupą placebo^{9,114}. W innym badaniu porównywano skuteczność monoterapii aliskirenem z irbesartanem oraz wpływ terapii łączonej tymi lekami na redukcję albuminurii¹⁴⁸. Wykazano, iż aliskiren i irbesartan porównywalnie obniżają albuminurię u pacjentów z nefropatią cukrzycową (odpowiednio 48% i 58% w porównaniu z placebo).

Persson i wsp. porównali wpływ dwumiesięcznej terapii różnymi dawkami aliskirenu na stopień redukcji albuminurii u chorych z cukrzycową chorobą nerek i nadciśnieniem tętniczym¹⁴⁴. Jak się okazało, obniżenie albuminurii było znamienne większe przy zastosowaniu aliskirenu w dawce 300 mg niż 150 mg (odpowiednio 48% i 36%) w porównaniu z placebo.

Jak wynika z powyższych badań, aliskiren jest lekiem charakteryzującym się istotnym potencjałem nefroprotektoryjnym. Na chwilę obecną brakuje jednak badań dotyczących nowych form terapii blokującej RAAs u chorych po przeszczepieniu nerki, w tym oceniających zastosowanie aliskirenu. Mając na uwadze te zastrzeżenia wydaje się, że słuszne było przeprowadzenie przez nasz zespół wstępnego badania z udziałem aliskirenu u chorych po przeszczepieniu nerki.

ROZDZIAŁ 2. CELE PRACY

Cel podstawowy

Porównanie wpływu terapii bezpośrednim inhibitorem reniny (DRI) – aliskirenem na wielkość **albuminurii** w odniesieniu do:

- bloker receptoru AT₁ dla angiotensyny II (ARA) – losartanu
- placebo

Cele drugorzędne

- Ocena wpływu aliskirenu na wydalanie z moczem wskaźnika uszkodzenia cewek nerkowych mierzone aktywnością **N-acetylo-β-D-glukozaminidazy (NAG)** w porównaniu do losartanu oraz placebo
- Porównanie wpływu terapii aliskirenem na wydalanie z moczem pośredniego wskaźnika włóknienia nerek (cytokiny profibrotycznej) - **Transformującego czynnika wzrostu β-1 (TGF-β1)** względem losartanu i placebo
- Porównanie wpływu terapii DRI na stres oksydacyjny mierzony wydalaniem **izoprostanu (8-epi-prostaglandyny-F_{2α} (8-EPI-PGF_{2α}))** względem ARA oraz placebo
- Ocena wpływu terapii aliskirenem na wielkość systemowego **ciśnienia tętniczego krwi** w porównaniu z losartanem i placebo
- Ocena bezpieczeństwa terapii aliskirenem w porównaniu z losartanem oraz placebo

ROZDZIAŁ 3. MATERIAŁ I METODY

1. Typ badania:

- Kontrolowane, podwójnie ślepe, randomizowane badanie typu cross-over.

Badanie przeprowadzone zostało w Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych oraz Zakładzie Żywienia Klinicznego i Diagnostyki Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr *NKEBN 163.2011* – załącznik w *Aneksie*).

Badanie zarejestrowane zostało w bazie www.clinicaltrials.gov pod numerem *NCT02446548*.

2. Populacja badania

Chorych uczestniczących w badaniu wybrano spośród pacjentów po przeszczepieniu nerki znajdujących się pod opieką Poradni Nefrologicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. W badaniu udział wzięło 18 pacjentów po udanej TN. Przed włączeniem do badania uczestnicy otrzymali szczegółowe informacje na temat projektu oraz przebiegu badania klinicznego, a następnie w sposób świadomy i dobrowolny wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Kobiety w wieku rozrodczym zobligowały się do stosowania skutecznej antykoncepcji w trakcie trwania badania.

Kryteria włączenia pacjentów do badania:

- Chorzy powyżej 18. r.ż.
- Minimalny okres 6 miesięcy po transplantacji nerki
- Stwierdzana stała albuminuria (wskaźnik stężenia albuminy do kreatyniny - UACR > 30 mg/g kreatyniny)
- Stosowana immunosupresja z zastosowaniem inhibitora kalcyneuryny (cyklosporyna A lub takrolimus)
- Stabilny poziom minimalnego stężenia (C_0) cyklosporyny A lub takrolimusu (bez wahań powyżej 25% w ciągu ostatnich 3 miesięcy)
- Stabilna funkcja nerek (zdefiniowana jako $eGFR > 30$ ml/min, bez wahań powyżej 5 ml/min/1.73 m² w ciągu 3 miesięcy poprzedzających badanie)

- Ciśnienie tętnicze krwi (BP) > 130/80 mmHg (bez leków hipotensyjnych) lub leczone nadciśnienie tętnicze (NT)

Kryteria wykluczające udział w badaniu:

- Stosowane do 3 miesięcy przed rozpoczęciem badania IKA lub ARA, bądź terapia tymi lekami trwająca dłużej niż 3 miesiące
- Stężenie potasu w surowicy krwi powyżej 5,5 mmol/L stwierdzone co najmniej dwukrotnie w ciągu ostatnich trzech miesięcy poprzedzających badanie
- Terapia immunosupresyjna z zastosowaniem inhibitorów sygnału proliferacji (mTOR)
- Zmiana immunosupresji w ciągu 3 miesięcy poprzedzających udział w badaniu
- Niestabilne poziomy leków z grupy CNI w ciągu 6 miesięcy poprzedzających badanie
- Zmiany dawek leków immunosupresyjnych w ostatnich 3 miesiącach
- Zwężenie tętnicy nerki przeszczepionej potwierdzone badaniem USG doppler (prędkość przepływu krwi w tętnicy nerkowej >200 cm/s) lub innymi metodami obrazowymi (angio-TK)
- Ciąża lub okres karmienia piersią
- Wszystkie schorzenia i/lub interwencje chirurgiczne, które mogą wpłynąć na absorpcję leków z przewodu pokarmowego
- Uzależnienie od alkoholu lub środków farmakologicznych
- Nadużywanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (> 2 dawki/ tydzień)
- Nietolerancja któregośkolwiek ze stosowanych w badaniu leków, zwłaszcza wystąpienie obrzęku naczynioruchowego w przeszłości po zastosowaniu IKA lub ARA
- Niestabilna choroba wieńcowa, niewyrównana niewydolność serca w ciągu ostatnich 6 miesięcy poprzedzających badanie lub dysfunkcja lewej komory serca, wymagająca leczenia IKA i/lub ARA
- Pacjenci ze zdarzeniem sercowo-naczyniowym tj.: epizodem nadciśnienia złośliwego, udaru mózgu, po przebytych ostrym zespole wieńcowym lub z wywiadem przemijającego ataku niedokrwiennego (*ang. TIA*) w ciągu sześciu miesięcy przed włączeniem do badania
- Pacjenci stosujący obecnie 4 lub więcej leków hipotensyjnych, u których średnia wartość ciśnienia tętniczego krwi (BP) podczas trzech wizyt utrzymuje się powyżej 150/100 mmHg
- Cukrzyca

Kryteria wcześniejszego zakończenia badania:

- Spadek eGFR > 20% wartości wyjściowej (potwierdzony dwukrotnie)
- Wzrost stężenia potasu w surowicy krwi powyżej 5,5 mmol/L (potwierdzony 2 razy)
- Spadek stężenia hemoglobiny o więcej niż 10% wartości wyjściowej

Szczegółowa charakterystyka grupy badanych pacjentów

W przeprowadzonym badaniu klinicznym udział wzięło 18 pacjentów w średnim wieku $49,8 \pm 2,3$ lat (w tym 3 powyżej 60. r.ż., co stanowiło 16,67% badanych), łącznie 13 mężczyzn (72,2%) i 5 kobiet (27,8%) rasy kaukaskiej, co najmniej 6 miesięcy po udanym przeszczepieniu nerki. Szczegółową charakterystykę pacjentów włączonych do badania podsumowano w poniższych tabelach 5 i 6.

Tabela 5. Charakterystyka pacjentów uczestniczących w badaniu

PARAMETR	WARTOŚĆ
Liczba chorych <i>n</i>	18
Płeć: męska/żeńska <i>n</i>	13 / 5
Wiek <i>lata</i> (min-maks)	$49,8 \pm 2,3$ (35 - 71)
Średni wskaźnik masy ciała [BMI] <i>kg/m²</i> w tym liczba pacjentów z: - prawidłową masą ciała [BMI 18,5 – 24,99] <i>n (%)</i> - nadwagą [BMI 25 – 29,99] <i>n (%)</i> - otyłością I stopnia [BMI 30 – 34,99] <i>n (%)</i> - otyłością II stopnia [BMI 35 – 39,99] <i>n (%)</i> Na podstawie interpretacji wartości BMI zawartej w [78, 53]	$27,6 \pm 1,1$ 5 (27,8%) 7 (38,9%) 5 (27,8%) 1 (5,6%)
Okres dializoterapii przed TN <i>miesiące</i> (zakres) w tym: - hemodializa [HD] <i>miesiące</i> - dializa otrzewnowa [DO] <i>miesiące</i>	$18,1 \pm 3,7$ (0 - 54) $21,1 \pm 4,1$ $15,5 \pm 10,5$
Liczba przeszczepów wyprzedzających (<i>pre - emptive</i>) <i>n (%)</i>	4 (22,2%)
Dawca obecnego przeszczepu: spokrewniony (żywy)/zmarły <i>n (%)</i>	1 (5,6%)/17 (94,4%)

Czas po transplantacji <i>miesiące</i> (zakres)	54,1 ± 8,4 (19 - 146)
Liczba pacjentów będących po retransplantacji <i>n (%)</i>	3 (16,7%)
Palenie tytoniu przed TN (<i>n=8</i>) [<i>paczkolata</i>] (zakres)	10,7 ± 3,3 (3 - 30)
Wskaźnik albumina/kreatynina [UACR] <i>mg/g kreatyniny</i>	149,9 (46,9 – 252,9)
Stężenie kreatyniny w surowicy krwi [Scr] <i>mg/dl</i>	1,38 ± 0,08
Wskaźnik filtracji kłębuszkowej (wg CKD-EPI) [eGFR] <i>ml/min</i> (zakres)	59,0 ± 4,15 (32,0 – 91,0)
Stężenie potasu w surowicy krwi <i>mmol/L</i>	3,93 ± 0,08
Dobowe wydalanie sodu <i>mmol/24h</i>	220,88 ± 25,84
Stężenie hemoglobiny [Hb] <i>g/dl</i>	13,9 ± 0,4
Liczba pacjentów stosujących immunosupresję z inhibitorem kalcyneuryny (CNI): - cyklosporyną A (CsA) <i>n (%)</i> - takrolimusem (TAC) <i>n (%)</i>	5 (27,8%) 13 (72,2%)
Liczba chorych stosujących następujące protokoły immunosupresyjne: - cyklosporyna A / mykofenolan mofetilu / metyloprednizolon <i>n</i> - cyklosporyna A / mykofenolan mofetilu / prednizon <i>n</i> - takrolimus / mykofenolan mofetilu / metyloprednizolon <i>n</i> - takrolimus / mykofenolan mofetilu / prednizon <i>n</i> - takrolimus / mykofenolan mofetilu / prednizon <i>n</i> - takrolimus / mykofenolan sodu / metyloprednizolon <i>n</i> - takrolimus / mykofenolan mofetilu <i>n</i> - takrolimus / prednizon <i>n</i>	4 1 5 1 3 1 2 1
Stężenie cyklosporyny A we krwi [CsA] <i>μg/l</i>	122,9 ± 1,6
Stężenie takrolimusu we krwi [TAC] <i>μg/l</i>	6,5 ± 0,52
Nadciśnienie tętnicze (obecne / nieobecne) <i>n</i>	13 / 5
Średnie skurczowe ciśnienie tętnicze krwi w gabinecie lekarskim [SBP] <i>mmHg</i>	130,9 ± 2,4
Średnie rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi w gabinecie lekarskim	82,3 ± 1,7

[DBP] mmHg	
Średnia liczba dodatkowych leków hipotensyjnych stosowanych podczas badania poza testowanymi blokerami układu RAA <i>n</i>	1,72 ± 0,36
Liczba pacjentów stosujących jednocześnie inne leki hipotensyjne poza blokerami układu RAA podczas badania: 1) bloker kanału wapniowego: amlodypina <i>n</i> 2) bloker receptorów α ₁ -adrenergicznych: doksazosyna <i>n</i> 3) blokery receptorów β ₁ -adrenergicznych: - metoprolol <i>n</i> - betaksolol <i>n</i> - bisoprolol <i>n</i> - atenolol <i>n</i> 4) bloker receptorów α ₁ - oraz β ₁ - i β ₂ -adrenergicznych: karwedilol <i>n</i> 5) diuretyk pętlowy: furosemid <i>n</i>	8 8 5 2 2 1 1 5
Liczba pacjentów stosujących inne leki hipotensyjne podczas badania oprócz badanych w następujących ilościach: - brak innych leków <i>n</i> - 1 lek <i>n</i> - 2 leki <i>n</i> - 3 leki <i>n</i> - 4 leki <i>n</i>	6 2 2 6 2

Powyższe wartości wyrażono jako średnia ± standardowy błąd pomiaru (SEM)

lub jako średnia geometryczna (z 95% przedziałem ufności) w przypadku UACR

Tabela 6. Podstawowa choroba nerek będąca przyczyną PChN w stadium 5

Rozpoznanie	Liczba chorych (<i>n</i> = 18)
Przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (PKZN) – bliżej nieokreślony typ histopatologiczny	6 (33,3%)
Autosomalnie dominujące wielotorbielowate zwyrodnienie nerek (ADPKD)	5 (27,8%)

Nefropatia nadciśnieniowa (NN)	3 (16,7%)
Nefropatia IgA (IgAN)	2 (11,1%)
Nefropatia zaporowa	1 (5,6%)
Przewlekła niewydolność nerek (PNN) o niejasnej etiologii	1 (5,6%)

Schematy immunosupresyjne uczestników badania zostały przedstawione w tabeli 5.

Zgodnie z założeniem badania podstawą leczenia immunosupresyjnego był inhibitor kalcyneuryny (CNI) i glikokortykoidy. Odpowiednio u 5 chorych (27,8%) pacjentów stosowano terapię z udziałem cyklosporyny A, natomiast u pozostałych 13 chorych (72,2%) było prowadzone leczenie takrolimusem, natomiast glikokortykoidy przyjmowało 16 uczestników (88,9%). Dawki CNI pozostały niezmienione przez cały czas prowadzonego badania.

Spośród 18 badanych, aż 17 otrzymywało lek antyproliferacyjny: mykofenolan mofetilu (MMF) lub mykofenolan sodu (MPS).

Leczenie nerkozastępcze przed obecną TN

Średni okres dializoterapii uczestników badania przed TN wynosił $18,2 \pm 3,7$ miesięcy, w tym czworo pacjentów (22,2%) otrzymało wyprzedzające przeszczepienie nerki, z czego troje od dawców zmarłych, a jedna osoba od dawcy żywego. Średni czas po transplantacji wynosił $54,1 \pm 8,4$ miesiące. Troje pacjentów było po retransplantacji (16,67%), z czego dwoje chorych otrzymało pierwszy przeszczep od spokrewnionego dawcy, które funkcjonowały 7 i 8 lat, trzeci biorca oba przeszczepy otrzymał od dawców zmarłych (pierwszy funkcjonował 12 lat). Różne były przyczyny późnej utraty pierwszego przeszczepu u tych pacjentów: mikroangiopatia zakrzepowa pod postacią rozwiniętego *de novo* zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS), związanego z leczeniem cyklosporyną A u jednej pacjentki, w drugim przypadku był to nawrót nefropatii IgA. Natomiast u trzeciego chorego po pierwszej transplantacji nie udało się ustalić przyczyny utraty przeszczepionego narządu. Spośród 18 uczestników badania, u trzech pacjentów stwierdzano DGF.

1) Nikotyzm

Przed TN 8 pacjentów paliło papierosy, a średni czas palenia przed TN oszacowany dla 8 palących wynosił około $10,7 \pm 3,3$ paczkolet (w zakresie od 3 do 30 paczkolet). Analizując nikotyzm w grupie 18 badanych, jeden pacjent nadal palił papierosy po TN, jednakże przed TN był on osobą palącą od ponad 30 lat.

2) Nadciśnienie tętnicze (NT) oraz stosowane leki hipotensyjne

Nadciśnienie tętnicze (NT) stwierdzono u 13 pacjentów (72,2%). W badanej grupie chorych u 12 stwierdzano nadciśnienie przed TN, a w przypadku jednego pacjenta było to nadciśnienie potransplantacyjne. Wszyscy chorzy mieli dobrą kontrolę ciśnienia tętniczego, przy czym jedna pacjentka ze zdiagnozowanym NT nie wymagała przyjmowania leków hipotensyjnych. Średnia wartość SBP przed włączeniem do badania wynosiła $130,9 \pm 2,4$ mmHg, a DBP $82,6 \pm 1,7$ mmHg.

W związku z powyższym, u 6 pacjentów podczas całego okresu *follow-up* jak wspomniano stosowano jedynie leki badane, natomiast pozostali 12 chorzy przyjmowali także inne leki przeciwnadciśnieniowe, których dawki dostosowano na etapie skriningu i nie zmieniono ich aż do zakończenia badania.

Średnia liczba leków hipotensyjnych stosowanych podczas badania przypadająca na każdego pacjenta wynosiła $1,72 \pm 0,36$, w tym 2 pacjentów stosowało jeden lek hipotensyjny, 2 chorzy przyjmowało dwa, 6 chorzy trzy i 2 pacjentów cztery leki hipotensyjne.

Stosowane leczenie hipotensyjne zostało szczegółowo przedstawione w tabeli 5.

Oprócz przedstawionych leków hipotensyjnych czterech pacjentów przyjmowało statyny (trzech - atorwastatynę i jeden – simwastatynę).

3) Przyczyna PChN stadium 5

Etiologia przewlekłej choroby nerek (PChN) pacjentów włączonych do badania została przedstawiona w tabeli 6. Pierwotną chorobą nerek, która doprowadziła do ich schyłkowej niewydolności było u 8 chorzy (44,4%) przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek (PKZN).

Drugie miejsce zajmowało autosomalnie dominujące wielotorbielowate zwyrodnienie nerek (ADPKD), które stwierdzano u 5 pacjentów (27,8%).

W 16,7% przypadków (u 3 badanych) zdiagnozowana została nadciśnieniowa choroba nerek, natomiast u jednego pacjenta (5,6%) - PChN o niejasnej etiologii oraz u jednego chorego (5,56%) – nefropatia zaporowa.

4) Ukończenie badania

Spośród 18 uczestników włączonych do badania, 16 (88,9%) ukończyło je zgodnie z protokołem (12 mężczyzn i 4 kobiety). Dwoje pacjentów wykluczono z badania w trakcie jego trwania, jednakże powodem nie były działania niepożądane prowadzonych terapii. Jednego pacjenta wykluczono z powodu wzrostu Scr w przebiegu zakażenia układu moczowego (ZUM) oraz choroby zakrzepowej żył głębokich lewej kończyny dolnej na podłożu zaburzeń krzepnięcia obecnych przed włączeniem do badania. Natomiast drugi chory zrezygnował z dalszego udziału w badaniu (w trakcie przyjmowania aliskirenu) z powodów osobistych - trudności z przybyciem na kolejną wizytę kontrolną.

3. Schemat badania

Preskrining: pośród pacjentów Poradni Nefrologicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego (UCK) w Gdańsku oznaczono albuminurię, oceniono kryteria włączenia do badania i wykluczające u wszystkich pacjentów spełniających warunki wstępne.

Okres skringu (*run-in*): rozpoczęcie badania było poprzedzone 8 tygodniowym okresem, w trakcie którego skorygowano dawki dotychczas przyjmowanych leków hipotensyjnych i pozostały one już niezmienione do końca badania. Celem tej fazy było utrzymanie ciśnienia tętniczego krwi $\leq 140/90$ mmHg.

Randomizacja

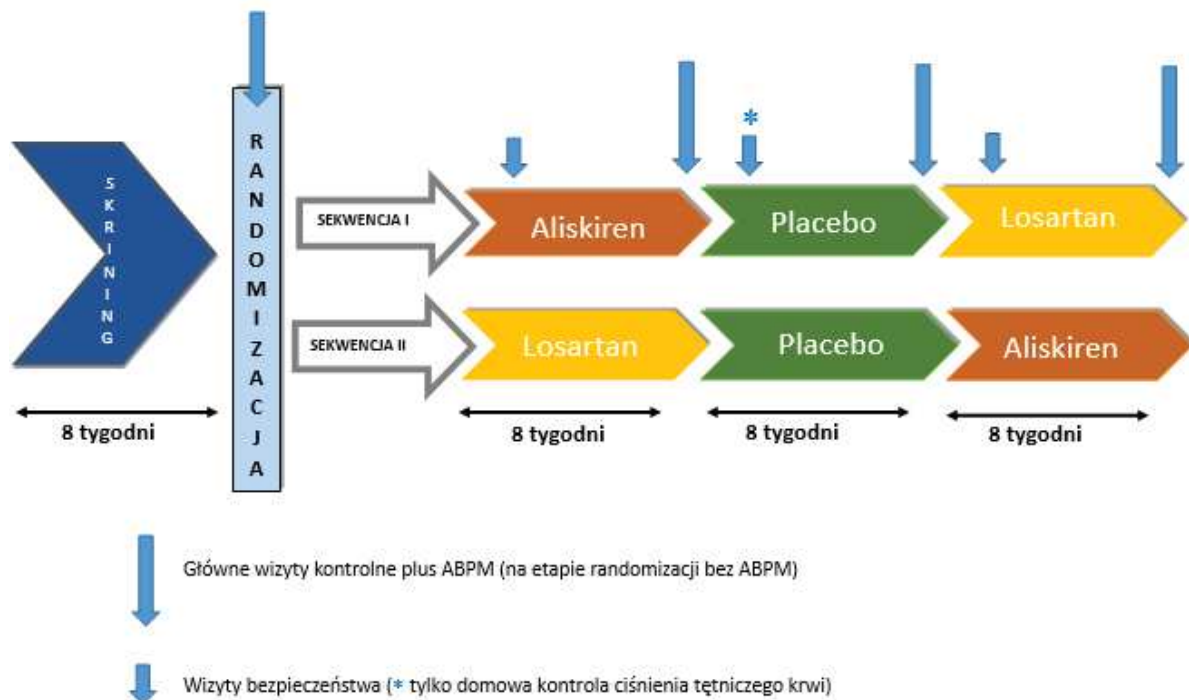
- Pośród pacjentów spełniający kryteria włączenia do badania dokonano randomizacji do terapii według dwóch sekwencji (rycina 4):

Sekwencja I: Aliskiren 150 mg – Placebo – Losartan 50 mg

Sekwencja II: Losartan 50 mg – Placebo – Aliskiren 150 mg

- **Aktywne leczenie:** badanie składało się z 3 okresów leczenia, z których każdy trwał 8 tygodni. Okresy leczenia następowały po sobie według dwóch sekwencji przedstawionych powyżej oraz na rycinie 4.

Rycina 4. Protokół badania



Wizyta „0” randomizacyjna, podczas której włączono jedną z dwóch, losowo przydzielonych sekwencji terapeutycznych, zgodnie z protokołem randomizacji (rycina 4), obejmującą początkowo aktywną terapię (aliskirenem lub losartanem).

Wizyty kontrolne (I, II i III) odbywały się w ostatnim dniu trwania danej terapii (aliskirenem, losartanem, jak też placebo), po przeprowadzeniu w dniu poprzedzającym wizytę badań laboratoryjnych oraz ABPM.

Plan wizyty kontrolnej obejmował:

- Wykonanie panelu badań laboratoryjnych: morfologia krwi obwodowej; Scr wraz z wyliczonym eGFR CKD-EPI, minimalnego stężenia (C_0) CsA lub TAC; stężenia potasu w surowicy krwi oraz sodu w dobowej zbiorce moczu (DZM)
- Przygotowanie porannej próbki moczu do zamrożenia celem oznaczenia: N-acetylo- β -D-glukozaminidazy (NAG), transformującego czynnika wzrostu β -1 (TGF- β 1), 8-epi-prostaglandyny- $F_{2\alpha}$; 8-EPI-PGF $_{2\alpha}$ (izoprostany) oraz oznaczenia UACR

- ABPM
- Wypełnienie kwestionariusza potencjalnych działań niepożądanych „de novo” prowadzonych terapii
- Wydanie pacjentowi zgodnie z protokołem badania opakowania z lekiem (próbki zaślepione)
- Standardowa wizyta z badaniem podmiotowym i przedmiotowym pacjenta.

Wizyta „bezpieczeństwa”

Dodatkowo po tygodniu od każdej wizyty głównej przewidziana była obligatoryjna wizyta „bezpieczeństwa” obejmująca wykonanie niżej wymienionych badań oraz kontakt telefoniczny lub osobisty z badaczem.

Cele wizyty „bezpieczeństwa” to:

- Kontrola ciśnienia tętniczego krwi (BP) - jeśli nie uzyskano $BP \leq 130/80$ mmHg dokonywano korekty leczenia hipotensyjnego (ewentualna modyfikacja dawki dihydropirydynowych blokerów kanału wapniowego (CCB) i/lub dołączenie doksazosyny. Protokół badania nie pozwalał na modyfikację dawek leków stosowanych przed włączeniem do badania (β -bloker, nie-dihydropirydynowy antagonistą wapnia, diuretyki)
- Oznaczenie Scr oraz potasu w surowicy krwi
- Konsultacja powyższych wyników badań, mająca na celu zapewnienie regularnego nadzoru klinicznego i laboratoryjnego nad pacjentem.

Stosowane leczenie

Przygotowania placebo oraz zaślepienie wszystkich leków dokonano w Zakładzie Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Randomizację przeprowadzono zgodnie z wygenerowaną przez osobę spoza zespołu badawczego, listą randomizacji. Do listy randomizacji przypisywano pacjentów według kolejności włączania ich do badania. Dane randomizacji utrzymywano w tajemnicy aż do momentu zakończenia badania oraz odślepienia badanych preparatów. Identyfikacja przez pacjentów leków badanych oraz placebo była uniemożliwiona na skutek identycznych

opakowań etykietowanych literami (A, B, C), co prezentuje rycina 5. Opakowania A i B zawierały substancję czynną, odpowiednio aliskiren i losartan, a opakowanie C placebo.

We wszystkich fazach głównych badania zalecano pacjentom codzienne przyjmowanie po jednej tabletki wydanego leku o tej samej porze w godzinach porannych, po posiłku, popijając wodą.

Uczestnicy badania zostali poinformowani o konieczności ograniczenia i utrzymania stałego spożycia sodu przez cały okres badania.

Pacjenci byli proszeni o zwrot opakowania z nieużyтыми tabletkami po każdym 8 tygodniowym okresie terapii i na tej podstawie oceniono przestrzeganie zaleceń (*adherence*).

Rycina 5. Leki zastosowane w badaniu klinicznym – forma zaślepienia leków i placebo



Metodyka

24-godzinna ambulatoryjna kontrola ciśnienia tętniczego krwi (ABPM)

Do pomiarów ABPM zastosowano atestowany rejestrator Mobil-O-Graph NG (wersja 20; I.E.M., Stolberg, Niemcy). Ciśnienie tętnicze krwi mierzono automatycznie w odstępach 15 - minutowych w ciągu dnia (od 07:00 do 22:00) oraz co 45 minut w nocnym przedziale czasowym (od 22:00 do 07:00). Dla uzyskania powtarzalności wyników zawsze stosowano urządzenie o tym samym numerze dla konkretnego pacjenta, mankiety natomiast zakładany

był na jednakową stronę ciała przez cały okres badania. Analizy wyników dokonano przy pomocy oprogramowania HMS Clint – Server 1.2 I.E.M. GmbH¹⁴⁹.

Badania laboratoryjne

Standardowe metody laboratoryjne

Morfologię krwi obwodowej, stężenie (C_0) CsA lub TAC, Scr (na podstawie, którego wyliczano eGFR z użyciem wzoru CKD-EPI) i potasu w surowicy krwi oraz sodu w DZM oznaczono zgodnie ze schematem badania standardowymi metodami używanymi w Centralnym Laboratorium Klinicznym (CLK) Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku (Aneks – tabela 16). Krew do tych badań pobierano rano, na czczo przy użyciu zamkniętego systemu próżniowego BD Vacutainer®

Oznaczenia aktywności N-acetylo- β -D-glukozaminidazy (NAG) oraz stężeń transformującego czynnika wzrostu β -1 (TGF- β 1), izoprostanów, czyli 8-epi-prostaglandyny- $F_{2\alpha}$ (8-EPI-PGF $_{2\alpha}$) i wskaźnika albuminy do kreatyniny (UACR) w porannej próbce moczu dokonano trzykrotnie (na koniec głównych faz badania), natomiast UACR oznaczono także w momencie randomizacji. Badania te wykonano w Laboratorium Zakładu Żywienia Klinicznego i Diagnostyki Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego po zakończeniu wszystkich faz badania. Materiał do badania, po uprzednim wirowaniu próbek moczu przy prędkości 3500 obrotów/minutę przez 5 minut w temperaturze pokojowej i pobraniu supernatantu, zamrożony i przechowywany był w temperaturze -70°C do czasu przeprowadzenia powyższych analiz.

Parametry oznaczone w Laboratorium Zakładu Żywienia Klinicznego i Diagnostyki Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego:

Albuminuria

Stężenie albuminy w porannej próbce moczu oznaczono za pomocą metody immunochemicznej fazy płynnej - immunoturbidymetrycznej z użyciem autoanalyzera Hitachi 704 i zestawu odczynnikowego firmy Roche. Do próbki moczu dodano przeciwciała przeciwko ludzkiej albuminie, uzyskując w rezultacie wytrącenie nierozpuszczalnych kompleksów i zmętnienie środowiska. Wykładnikiem stężenia albumin w moczu był pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$. Stężenie albuminy było standaryzowane wobec

stężenia kreatyniny, oznaczonej w tej samej próbce moczu, uzyskując wskaźnik stężenia albuminy do kreatyniny (UACR) wyrażony w mg/g kreatyniny.

Stężenie kreatyniny w moczu (Ucr)

Do oznaczenia stężenia kreatyniny zastosowano kolorymetryczną, kinetyczną, zmodyfikowaną metodę Jaffe'go bez odbiałczania, wykorzystującą tworzenie się barwnego kompleksu kreatyniny z kwasem pikrynowym w środowisku alkalicznym. Zastosowano zestaw odczynnikowy firmy Roche oraz autoanalyzer Hitachi 704. Intensywność zabarwienia przy długości fali $\lambda = 570$ nm była proporcjonalna do stężenia kreatyniny w próbach badanych.

Aktywność N - acetylo - β - D - glukozaminidazy (NAG)

Do oznaczenia aktywności powyższego parametru w porannej próbce moczu, w serii niejednoczesnej zastosowano metodę spektrofotometryczną opracowaną i zmodyfikowaną przez zespół Prof. W. Łysiak-Szydlowskiej¹⁵⁰. W niniejszej pracy analizowano poranną próbkę moczu, aby uniknąć m.in. potencjalnych interferencji domieszką nasienia u mężczyzn, wpływającą na aktywność NAG¹⁵¹.

Zastosowaną aparaturą pomiarową był fotometr EPOLL-2 z blokiem grzewczym o temperaturze 37°C.

Zgodnie z ogólnymi zaleceniami wartości NAG wyrażono jako IU/g kreatyniny.

Stężenie transformującego czynnika wzrostu β - 1 (TGF - β 1)

Stężenie TGF- β 1 w porannej próbce moczu oznaczono w serii jednoczesnej przy pomocy immunoenzymatycznego, kolorymetrycznego, komercyjnego testu ELISA fazy stałej typu „sandwich” („kanapkowy”), tzw. testu podwójnego wiązania (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN)¹⁵².

Wewnątrz- i zewnątrzlaboratoryjny współczynnik zmienności (CV) wynosił odpowiednio: 2,8% i 7,5%, natomiast zakres detekcji oznaczanego parametru mieścił się w granicach od 1,7 do 15,4 pg/ml. Reakcje krzyżowe w zastosowanym teście sięgały około 15% (mogły one zachodzić z ludzkim TGF- β 1.2 oraz zwierzęcym TGF- β 1 t.j.: świńskim, mysim, szczurzym czy psim). Stężenie TGF- β 1 wyrażono w pg/mg kreatyniny oznaczonej w tej samej próbce moczu.

Stężenie izoprostanów (8-*epi*-prostaglandyny- $F_{2\alpha}$; 8-EPI-PGF $_{2\alpha}$)

Stężenie izoprostanów w porannej próbce moczu analizowano w serii jednoczesnej przy użyciu kompetycyjnego, komercyjnego, immunoenzymatycznego testu fazy stałej ELISA (BIOXYTECH; OxisResearch, Foster City, CA)¹⁵³.

Absorbancja wszystkich prób badanych, jak też serii standardów została odczytana względem próby odczynnikowej (zerowej) przy $\lambda=450$ nm przy użyciu spektrofotometru DRG E-LIZA MAT-3000 z automatycznym czytnikiem.

Krzywa kalibracyjna dla oznaczanego parametru została skonstruowana w oparciu o serię standardów (kalibratorów). Stężenie prób badanych określono na podstawie wykreślonej krzywej kalibracyjnej, po uprzednim odczytaniu absorbancji prób badanych względem próby zerowej (standardu o stężeniu 0 pg/ml) i pomnożeniu otrzymanego wyniku, odpowiednio przez wartość rozcieńczenia.

Czułość testu dla oznaczanego związku (8-EPI-PGF $_{2\alpha}$) wynosiła 100%. Test wykluczał interferencje wskutek niespecyficznych wiązań, jednakże dopuszczał reaktywność krzyżową z: 9 α ,11 β -PGF $_{2\alpha}$ (4,1%); 13,14-dihydro-15-keto-PGF $_{2\alpha}$ (3%); 9 α ,11 β -PGF $_{2\alpha}$ (<0,01%); PGF $_{2\alpha}$ (<0,01%); 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ (<0,01%); PG E $_2$ (<0,01%); PG D $_2$ (<0,01%) oraz z kwasem arachidonowym (<0,01%). Stężenie izoprostanów wyrażono w ng/mg kreatyniny z tej samej próbki moczu.

Szczegółową metodologię powyższych analiz zawarto w Aneksie.

Metody statystyczne

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy licencjonowanej wersji oprogramowania STATISTICA (wersja 10.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK).

Rozkład wartości poszczególnych parametrów analizowano w celu sprawdzenia ich podobieństwa do rozkładu normalnego przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji natomiast zweryfikowano testem Levene'a. Ocena statystycznej zmienności różnic pomiędzy zmiennymi zależnymi, przeprowadzona została za pomocą parametrycznego testu ANOVA (analiza wariancji) dla powtarzalnych pomiarów. Dotyczyło to porównania różnic między zmiennymi uzyskanymi po leczeniu aliskirenem 150 mg/d., losartanem 50 mg/d. i placebo. Dalsze szczegółowe analizy statystyczne przeprowadzono testami *post-hoc* z korektą Bonferroni'ego dla sparowanych porównań.

Dane z wcześniejszych badań, przeprowadzonych przez naszą Klinikę, posłużyły do oszacowania najmniejszej, wymaganej liczby chorych (*minimalnej niezbędnej wielkości próby badanej; ang. sample size calculation*), biorącej udział w badaniu. Przewidywano, że wyjściowa albuminuria (dobowe wydalanie albuminy; UAER) u chorych po TN bez jawnego klinicznie białkomoczu wyniesie 108 mg/24 h. Zakładając, że uzyska się 30% redukcję tego parametru pod wpływem aliskirenu w porównaniu z placebo, oczekiwano obniżenie albuminurii z wartości 108 mg/24 h do 75,6 mg/24 h w efekcie terapii aliskirenem.

Zgodnie z powyższymi wymogami, 12 pacjentów powinno ukończyć badanie, aby różnice uznać jako znamienne statystycznie przy osiągnięciu $\geq 80\%$ mocy badania, na poziomie statystycznej znamienności $p < 0,05$ i oczekiwanym odchyleniu standardowym 25 mg/24 h. Grupa chorych, zrekrutowanych do badania klinicznego liczyła więc 18 pacjentów, zakładając możliwość ich rezygnacji z udziału w trakcie badania m.in. z powodu wycofania przez nich świadomej zgody na dalszy w nim udział. Różnice uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$ (dwustronne).

Różnice pomiędzy włączeniem aktywnej terapii, po tygodniu jej stosowania dla stężenia potasu i kreatyniny w surowicy krwi oraz wskaźnika eGFR analizowano testem t-Studenta dla prób zależnych. Podobnie, testem tym oceniono wyżej wymienione różnice (zmiany w czasie) obu aktywnych terapii również w odniesieniu dla powyższych parametrów. Porównanie występowania działań niepożądanych po leczeniu aliskirenem 150 mg/dobę, losartanem 50 mg/dobę i placebo dla zmiennych zależnych dychotomicznych sprawdzono przy pomocy nieparametrycznego testu Q-Cochrana.

Do oceny zależności pomiędzy UACR, a SBP i DBP, zarówno w przypadku aliskirenu, jak i losartanu użyto regresji wielorakiej. Korelacje pomiędzy UACR, a SBP i DBP zbadano również testem istotności współczynnika korelacji Pearsona.

Ze względu na różną dystrybucję zmiennych - wartości parametrów: UACR, NAG oraz TGF- β 1 przekształcono logarytmicznie przed analizą statystyczną i wyrażono jako średnie geometryczne z 95% przedziałem ufności (CI 95%), natomiast wyniki pozostałych analiz wyrażono jako średnia arytmetyczna $\pm$ standardowy błąd pomiaru (SEM).

ROZDZIAŁ 4. WYNIKI

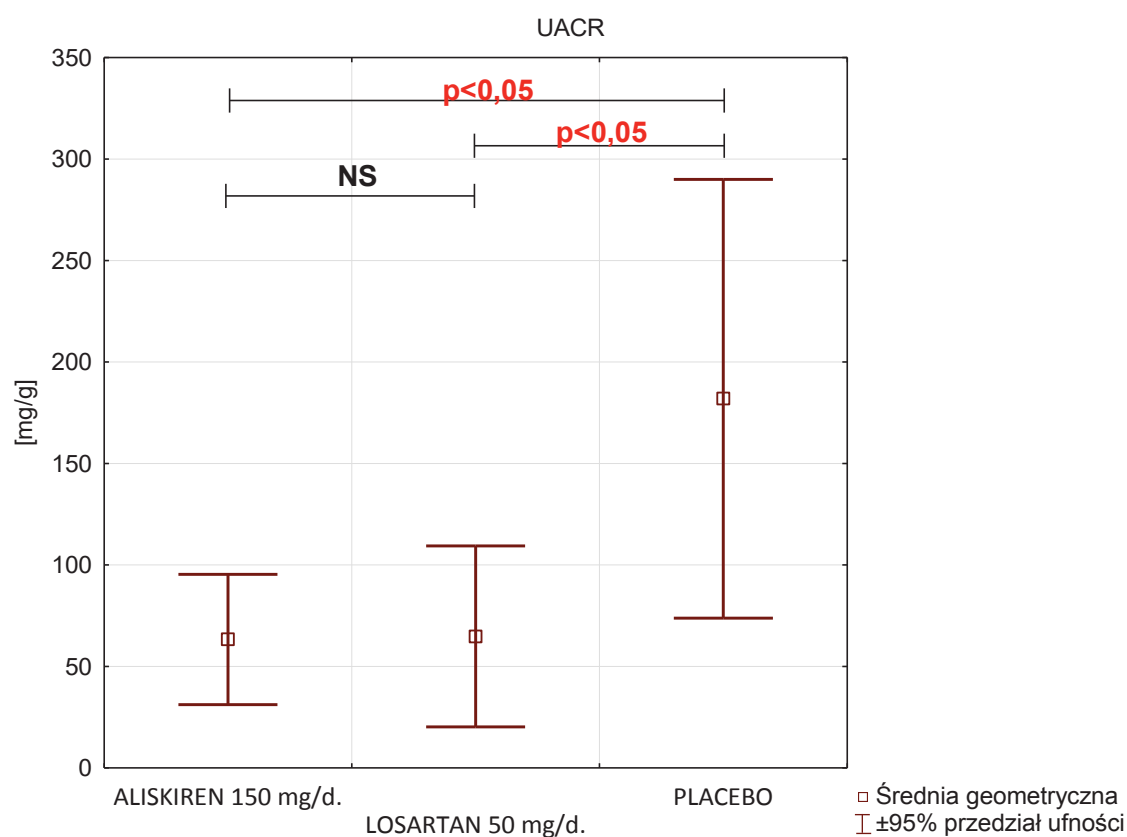
Wskaźnik albumina/kreatynina w moczu (UACR)

Wykazano, że terapia aliskirenem, jak również losartanem spowodowała znamienne statystycznie obniżenie UACR w porannej próbce moczu w porównaniu do placebo (analiza *post-hoc*: $p=0,032$; $p=0,04$, odpowiednio).

Natomiast nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w obniżeniu UACR pomiędzy aliskirenem a losartanem (63,3 mg/g vs 64,8 mg/g). Wyniki te zostały również przedstawione na rycinie 6 i w tabeli 7.

Rycina 6.

Wskaźnik stężenia albumina/kreatynina (UACR) w poszczególnych fazach badania



Całodobowe ambulatoryjne monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi (ABPM)

A) Średnie 24-godzinne skurczowe ciśnienie tętnicze krwi (SBP)

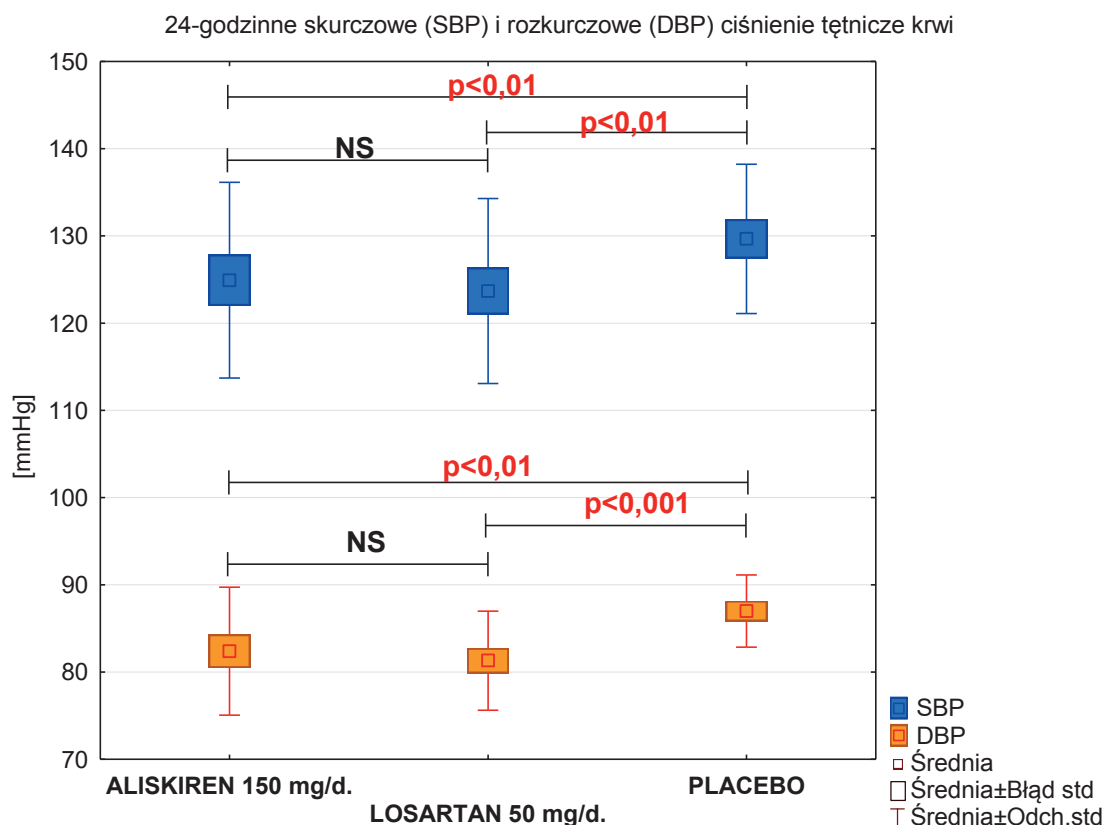
Wykazano znaczącą statystycznie redukcję średniego 24-godzinnego SBP w trakcie terapii aliskirenem (analiza *post-hoc*: $p=0,009$), a także losartanem (analiza *post-hoc*: $p=0,003$) w porównaniu do placebo. Wartości SBP wynosiły odpowiednio, po terapii DRI: $124,9 \pm 2,9$ mmHg vs po terapii ARA: $123,7 \pm 2,6$ mmHg vs po placebo: $129,8 \pm 2,0$ mmHg. Nie stwierdzono natomiast różnicy statystycznie istotnej w wartościach uzyskanych w profilu dobowym skurczowego ciśnienia tętniczego krwi pomiędzy aliskirenem a losartanem (ryc. 7).

B) Średnie 24-godzinne rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi (DBP)

Również istotnie niższe średnie DBP osiągnięto w grupach stosujących aliskiren oraz losartan względem placebo (analiza *post-hoc*: $p=0,003$; $p=0,0005$, odpowiednio). DBP po terapii aliskirenem wynosiło: $82,4 \pm 1,8$ mmHg vs po terapii losartanem: $81,3 \pm 1,4$ mmHg vs po placebo: $87,0 \pm 1,6$ mmHg. Obie aktywne terapie natomiast nie różniły się w aspekcie DBP pomiędzy sobą, co szczegółowo przedstawiono na rycinie 7.

Rycina 7.

SBP i DBP uzyskane na podstawie ABPM podczas poszczególnych faz badania



**Podsumowanie uzyskanych wyników i graficzna prezentacja wybranych parametrów
po 8 tygodniowych okresach terapeutycznych**

Tabela 7

Parametry kliniczne i biochemiczne podczas poszczególnych faz badania

Parametr	Aliskiren (150 mg/d.)	Losartan (50 mg/d.)	Placebo	p ANOVA
SBP [mm Hg]	124,9 ± 2,9 ⁴	123,7 ± 2,6 ⁴	129,8 ± 2,0	p < 0,01
DBP [mm Hg]	82,4 ± 1,8 ⁴	81,3 ± 1,4 ³	87,0 ± 1,6	p < 0,001
UACR [mg/g kreatyniny]	63,3 ¹ (31,2 – 95,4)	64,8 ¹ (20,2 – 109,4)	182,0 (73,8 – 290,0)	p < 0,05
Dobowe wydalanie sodu [mmol/24h]	261,3 ± 19,9 ^{1,2}	211,0 ± 17,5	217,4 ± 29,7	p < 0,05
Stężenie hemoglobiny [g/dl]	13,4 ± 0,4 ¹	13,3 ± 0,4 ¹	13,6 ± 0,4	p < 0,05
Stężenie kreatyniny w surowicy krwi [mg/dl]	1,53 ± 0,1	1,47 ± 0,1	1,46 ± 0,1	NS (p=0,59)
eGFR CKD-EPI [ml/min]	54,6 ± 4,7	56,8 ± 4,9	56,4 ± 4,6	NS (p=0,50)
Stężenie potasu w surowicy [mmol/L]	4,25 ± 0,49	4,16 ± 0,52	4,09 ± 0,24	NS (p=0,59)
Stężenie cyklosporyny A we krwi [μg/l]	93,6 ± 10,2	107,1 ± 13,6	113,7 ± 14,1	NS (p=0,06)
Stężenie takrolimusu we krwi [μg/l]	6,6 ± 0,5	6,3 ± 0,6	6,7 ± 0,7	NS (p=0,05)

Wyniki wyrażono jako średnia ± standardowy błąd pomiaru (SEM) lub średnia geometryczna (z 95% przedziałem ufności) w przypadku UACR

NS - różnica nieistotna statystycznie

p – poziom istotności statystycznej wyznaczony za pomocą testu ANOVA z powtarzanymi pomiarami

Poszczególne wartości ciśnienia tętniczego krwi (SBP, DBP) analizowano na podstawie ABPM

¹Znamienność w porównaniu do placebo ($p < 0,05$)

²Znamienność w porównaniu do losartanu ($p < 0,05$)

³Znamienność w porównaniu do placebo ($p < 0,001$)

⁴Znamienność w porównaniu do placebo ($p < 0,01$)

Zależność pomiędzy redukcją białkomoczu a zmianą ciśnienia tętniczego krwi w trakcie terapii aliskirenem i losartanem

Jak powyżej przedstawiono zmniejszenie albuminurii oraz ciśnienia tętniczego (SBP i DBP) podczas obu typów terapii było istotne względem placebo, niemniej jednak w kolejnych analizach (poniżej) wykazano, że redukcja albuminurii była niezależna od zmian ciśnienia tętniczego krwi.

Test istotności współczynnika korelacji liniowej Pearsona nie wykazał istotnych statystycznie korelacji pomiędzy UACR a skurczowym (SBP), ani rozkurczowym (DBP) ciśnieniem tętniczym krwi, zarówno w przypadku terapii aliskirenem, jak i terapii losartanem.

Analiza korelacji pomiędzy UACR a ciśnieniem tętniczym (SBP i DBP)

Tabela 8

Zależność pomiędzy UACR a SBP i DBP krwi po 8-tygodniowej terapii aliskirenem i losartanem

TERAPIA	PARA ZMIENNYCH	r_{xy}	p
Aliskiren	UACR & SBP	0,381	NS ($p=0,18$)
	UACR & DBP	0,326	NS ($p=0,26$)
Losartan	UACR & SBP	0,100	NS ($p=0,72$)
	UACR & DBP	0,104	NS ($p=0,71$)

r_{xy} – współczynnik korelacji liniowej Pearsona

p – poziom istotności statystycznej

UACR a zmiany ciśnienia tętniczego (SBP i DBP) - analiza regresji wielorakiej

Zmienna zależna: UACR po 8- tygodniowej terapii

Zmienna niezależna: SBP po 8-tygodniowej terapii oraz DBP po 8-tygodniowej terapii

Tabela 9

Regresja wieloraka dla zmiennej zależnej UACR w przypadku terapii aliskirenem

Podsumowanie regresji zmiennej zależnej: UACR [mg/g] R=0,44627619; R ² =0,19916244; Popraw. R ² =0,05355561 F(2,11)=1,3678; p<0,29478; Błąd standardowy estymacji: 58,260						
	BETA	BŁĄD STANDARDOWY Z BETA	B	BŁĄD STANDARDOWY Z B	t	p
Wyraz wolny			-344,37	254,75	-1,35	0,20358
SBP [mmHg] "	0,316	0,280	1,70	1,51	1,13	0,28333
DBP [mmHg]	0,242	0,280	2,44	2,82	0,86	0,40630

Wartości testu t-Studenta t i odpowiadające mu poziomy prawdopodobieństwa p wskazują, że parametry SBP i DBP oraz wyraz wolny nie są istotne statystycznie (p>0,05). Oznacza to, że SBP jak i DBP nie mają wpływu na UACR w przypadku terapii aliskirenem.

Tabela 10

Regresja wieloraka dla zmiennej zależnej UACR w przypadku terapii losartanem

Podsumowanie regresji zmiennej zależnej: UACR [mg/g] R=0,11672781; R ² =0,01362538; Popraw. R ² = ----- F(2,12)=0,08288; p<0,92098; Błąd standardowy estymacji: 92,543						
	BETA	BŁĄD STANDARDOWY Z BETA	B	BŁĄD STANDARDOWY Z B	t	p
Wyraz wolny			-82,53	372,43	-0,22	0,82835
SBP [mmHg] "	0,063	0,335	0,50	2,66	0,19	0,85514
DBP [mmHg]	0,071	0,335	1,09	5,11	0,21	0,83516

Wartości testu t-Studenta t i odpowiadające mu poziomy prawdopodobieństwa p wskazują, że parametry SBP i DBP oraz wyraz wolny nie są istotne statystycznie ($p > 0,05$). Oznacza to, że SBP, jak również DBP nie mają wpływu na UACR w przypadku terapii losartanem.

Ocena funkcji wydalniczej nerek

Czynność przeszczepionej nerki wyrażana za pomocą Scr oraz na podstawie oszacowanego wskaźnika wielkości filtracji kłębuszkowej (eGFR), obliczonego według wzoru CKD-EPI pozostała stabilna podczas wszystkich faz badania. eGFR wynosił odpowiednio, po terapii z aliskirenem: $54,6 \pm 4,7$ ml/min vs po terapii losartanem: $56,8 \pm 4,9$ ml/min vs po etapie placebo: $56,4 \pm 4,6$ ml/min (NS; $p = 0,50$), co prezentuje tabela 7.

Wykazano także porównywalne wartości kreatyninemii podczas 3 okresów terapeutycznych. Odpowiednio, po aliskirenem: $1,53 \pm 0,1$ mg/dl vs po losartanie: $1,47 \pm 0,1$ mg/dl vs po placebo: $1,46 \pm 0,1$ mg/dl (NS; $p = 0,59$).

Stężenie potasu w surowicy krwi

Podczas trzech zastosowanych typów terapii obserwowano porównywalną kaliemię, i tak po terapii DRI wynosiła średnio $4,25 \pm 0,49$ mmol/L vs po terapii ARA $4,16 \pm 0,52$ mmol/L vs po placebo: $4,09 \pm 0,24$ mmol/L (NS; $p = 0,59$). U żadnego z pacjentów nie odnotowano w trakcie badania wzrostu stężenia potasu powyżej 5,5 mmol/L.

Dobowe wydalanie sodu

Stwierdzono istotne statystycznie różnice w ilości dobowego wydalania sodu pomiędzy poszczególnymi okresami leczenia, co szczegółowo przedstawia tabela 7. Podczas leczenia aliskirenem obserwowano znamienne wyższe dobowe wydalanie sodu względem terapii losartanem (analiza *post-hoc*: $p = 0,034$), jak również względem placebo (analiza *post-hoc*: $p = 0,035$).

Stężenie inhibitorów kalcyneuryny

Stężenie CsA, jak i TAC pozostawało niezmiennie w trakcie trzech okresów badania. Poziom CsA po leczeniu aliskirenem wynosił: $93,6 \pm 10,2 \mu\text{g/l}$ vs po terapii losartanem: $107,1 \pm 13,6 \mu\text{g/l}$ vs po placebo: $113,7 \pm 14,1 \mu\text{g/l}$ (NS; $p=0,06$).

Natomiast stężenie TAC wynosiło odpowiednio $6,6 \pm 0,5 \mu\text{g/l}$ (aliskiren) vs $6,3 \pm 0,6 \mu\text{g/l}$ (losartan) vs $6,7 \pm 0,7 \mu\text{g/l}$ (placebo) (NS; $p=0,05$).

Morfologia krwi obwodowej - ocena stężenia hemoglobiny

Znaczący statystycznie, lecz nieistotny klinicznie, spadek stężenia hemoglobiny odnotowano zarówno po terapii z udziałem aliskirenu, jak i losartanu (analiza *post-hoc*: $p=0,033$; $p=0,047$) w odniesieniu do placebo. W efekcie poszczególnych terapii stężenie hemoglobiny wynosiło odpowiednio: $13,4 \pm 0,4 \text{ g/dl}$ podczas stosowania aliskirenu vs $13,3 \pm 0,4 \text{ g/dl}$ po losartanie vs $13,6 \pm 0,4 \text{ g/dl}$ po okresie placebo. Natomiast nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic pomiędzy stosowaniem aliskirenu i losartanu w tym zakresie. Pomimo znamienego obniżenia się stężenia hemoglobiny u żadnego z pacjentów nie obserwowano objawów niedokrwistości, ani też nie było konieczności wdrożenia jej leczenia (u jednej pacjentki podczas terapii losartanem zastosowano żelazo w postaci dożylniej, jednakże chora ta już na etapie randomizacji wykazywała niższe od zakresu prawidłowego wartości hemoglobiny)

**Wpływ badanych terapii na biomarkery uszkodzenia cewkowo-śródmięszowego,
stresu oksydacyjnego i włóknienia nerki przeszczepionej**

Tabela 11

Wpływ aliskirenu i losartanu na drugorzędowe punkty końcowe badania

Parametr	Aliskiren (150 mg)	Losartan (50 mg)	Placebo	p ANOVA
Aktywność N-acetylo-β-D-glukozaminidazy [NAG] IU/g kreatyniny	2,76 (1,82 – 3,69)	2,08 ¹ (1,67 – 2,49)	3,17 (2,23 – 4,12)	p < 0,01
8-epi-prostaglandyny-F _{2α} [Izoprostany] ng/mg kreatyniny	5,06 ± 0,49	5,20 ± 0,37	5,58 ± 0,59	NS (p=0,85)
Transformujący czynnik wzrostu β-1 [TGF – β1] do stężenia kreatyniny pg/mg	5,48 (2,79 – 8,18)	5,09 (1,83 – 8,34)	6,76 (4,73 – 8,79)	NS (p=0,43)

Wyniki wyrażono jako średnia ± standardowy błąd pomiaru (SEM) lub jako średnia geometryczna (z 95% przedziałem ufności) w przypadku NAG i TGF – β1

NS - różnica nieistotna statystycznie

p – poziom istotności statystycznej (wyznaczony za pomocą testu ANOVA z powtarzanymi pomiarami)

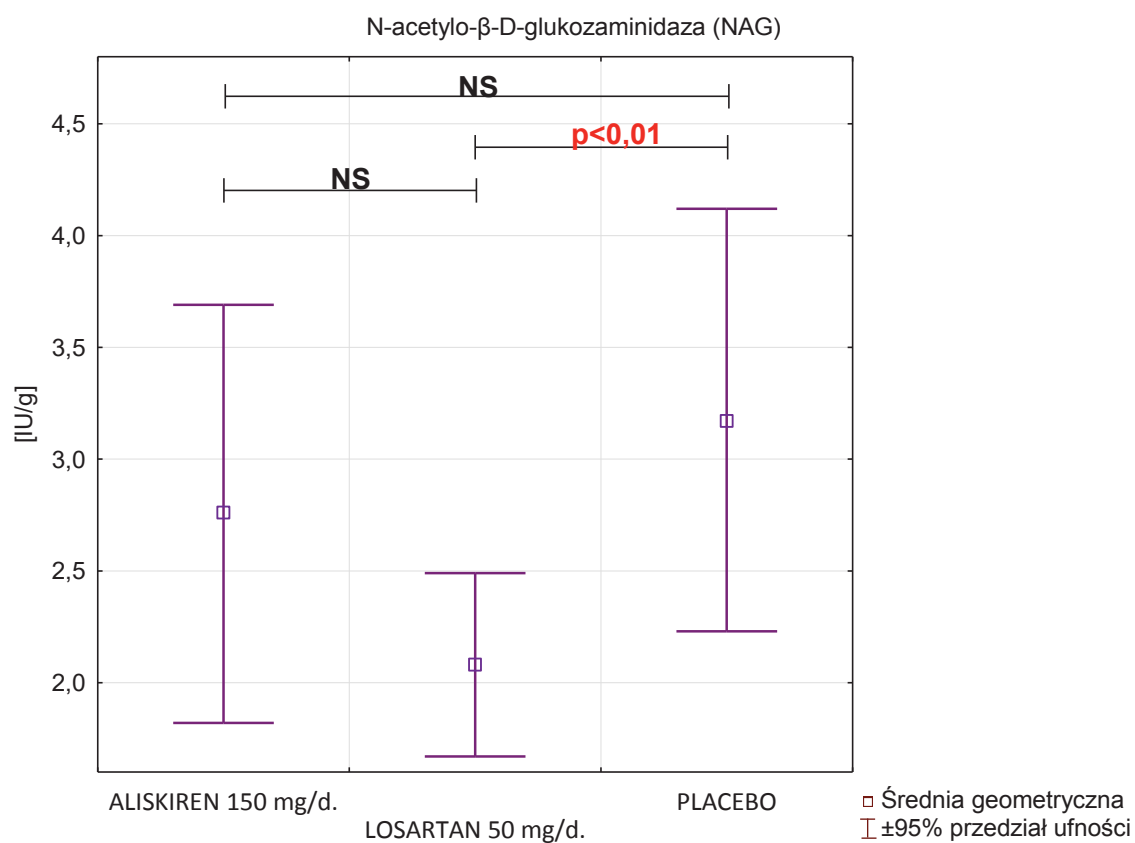
¹Znamienność w porównaniu do placebo (p < 0,01)

N-acetylo-β-D-glukozaminidaza (NAG) - wykładnik uszkodzenia cewkowo-śródmięszowego

Podczas obu aktywnych terapii wykazano zmniejszenie aktywności N-acetylo-β-D-glukozaminidazy względem placebo, jednakże tylko w przypadku losartanu różnica ta była istotna statystycznie (analiza *post-hoc*: p=0,009). Terapia bezpośrednim inhibitorem reniny (DRI) obniżyła wydalanie z moczem NAG do wartości 2,76 IU/g kreatyniny, a w trakcie leczenia blokerem receptora AT₁ (ARA) wynosiło 2,08 IU/g kreatyniny, natomiast po stosowaniu placebo aktywność NAG wynosiła 3,17 IU/g kreatyniny. Oba typy terapii blokującej RAAs nie różniły się względem siebie w tym aspekcie, nie wykazując wobec siebie znamienności statystycznej, co ukazano na rycinie 8 i w tabeli 11.

Rycina 8.

Porównanie zmian aktywności N-acetylo- β -D-glukozaminidazy (NAG) w moczu podczas terapii aliskirenem i losartanem oraz placebo

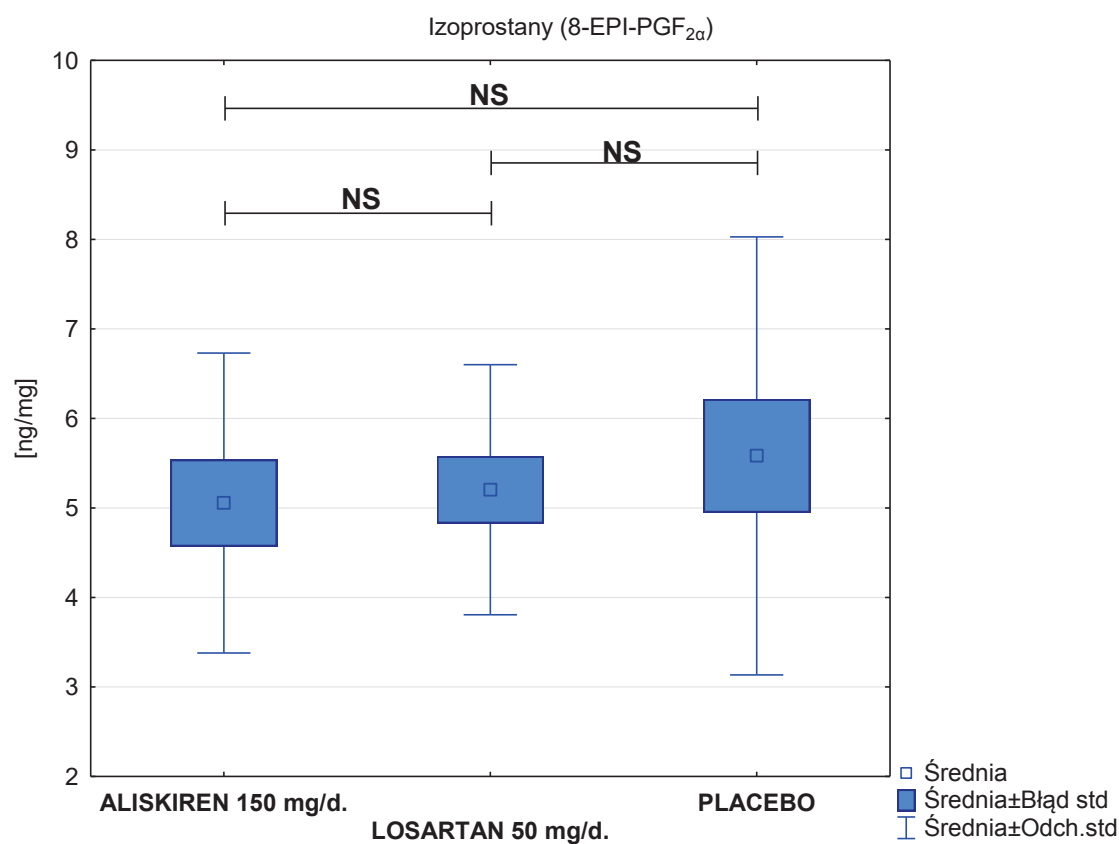


Izoprostany (8-*epi*-prostaglandyny- $F_{2\alpha}$; 8-EPI-PGF $_{2\alpha}$) - wykładnik stresu oksydacyjnego

Wydalanie z moczem izoprostanów było niższe w trakcie terapii aliskirenem i losartanem, w odniesieniu do placebo (rycina 9 i tabela 11), niemniej różnice te nie były statystycznie znamienne. Aktywne terapie także nie różniły się istotnie w ocenianym parametrze względem siebie.

Rycina 9.

Wpływ zastosowanych terapii na wydalanie z moczem izoprostanów (8-EPI - $\text{PGF}_{2\alpha}$)

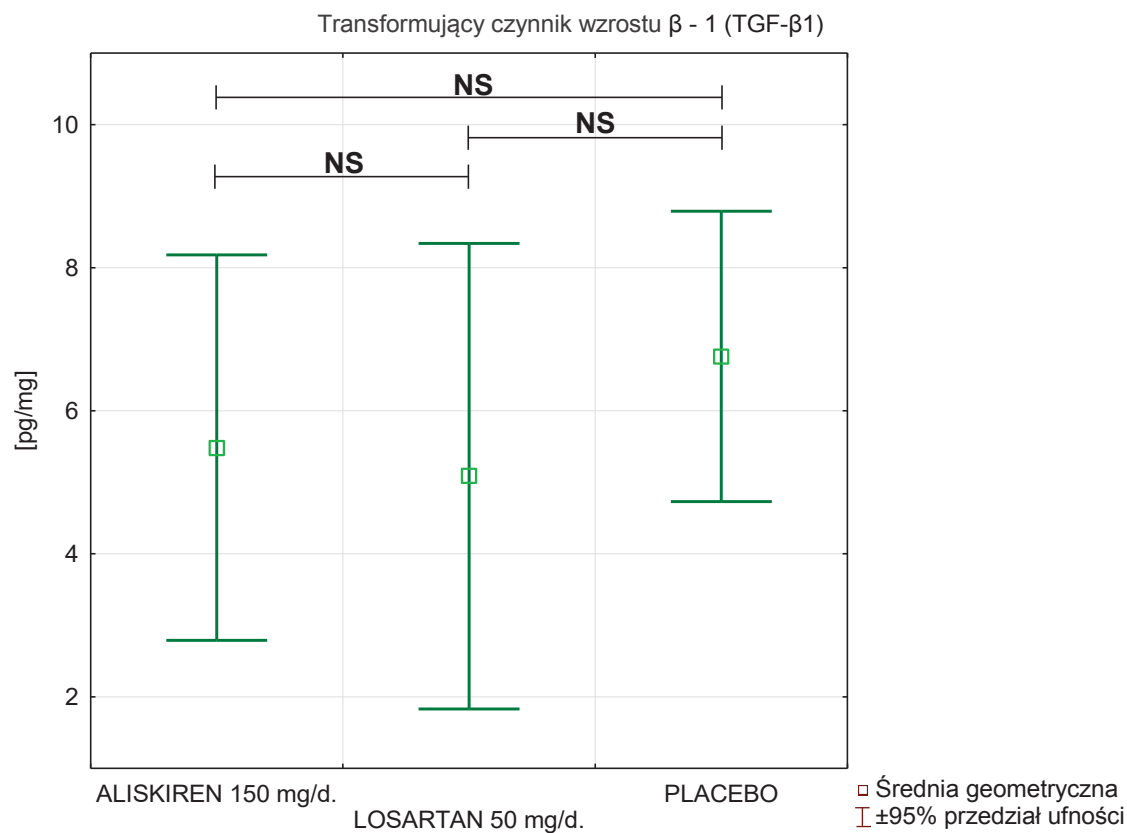


Transformujący czynnik wzrostu β - 1 ($\text{TGF-}\beta$ 1) - wykładnik włóknienia graftu

Zarówno aliskiren, jak i losartan zmniejszały wydalanie z moczem $\text{TGF-}\beta$ 1, jednak trend ten nie wykazywał istotności statystycznej. W trakcie terapii aliskirenem uzyskano wartość 5,48 pg/mg kreatyniny vs w wyniku leczenia losartanem 5,09 pg/mg kreatyniny, natomiast po placebo: 6,76 pg/mg kreatyniny (NS; $p=0,43$). Nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy aliskirenem, a losartanem w tym zakresie. Wyniki przedstawiono także na rycinie 10 oraz w tabeli 11.

Rycina 10.

Wpływ aliskirenu i losartanu na wydalanie z moczem TGF- β 1



Monitorowanie profilu bezpieczeństwa i tolerancji zastosowanych terapii

Wpływ zastosowanych leków na stężenie potasu i kreatyniny w surowicy krwi oraz oszacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej (eGFR) po 7 dniach trwania terapii – ocena bezpieczeństwa prowadzonego leczenia

Tabela 12

Podsumowanie zmian głównych parametrów laboratoryjnych w czasie trwania badania

PARAMETR	A	A*	B	B*	A vs A* p	B vs B* p
eGFR CKD-EPI [ml/min]	57,5 ± 4,2	62,1 ± 5,9	58,2 ± 4,9	60,5 ± 5,0	NS (p=0,33)	NS (p=0,36)

Scr [mg/dl]	1,43 ± 0,1	1,33 ± 0,1	1,43 ± 0,1	1,37 ± 0,1	NS (p=0,59)	NS (p=0,37)
Stężenie potasu w surowicy krwi [mmol/L]	4,04 ± 0,08	4,33 ± 0,09	3,98 ± 0,07	4,35 ± 0,10	p < 0,01	p < 0,001

Dane wyrażono jako średnia ± standardowy błąd pomiaru (SEM)

A - wyniki w momencie włączenia aliskirenu (150 mg/d.)

A* - wyniki po tygodniu stosowania aliskirenu

B - wyniki w momencie włączenia losartanu (50 mg/d.)

B* - wyniki po tygodniu stosowania losartanu

NS - różnica nieistotna statystycznie

p - poziom istotności statystycznej (wyznaczony testem t – Studenta dla prób zależnych)

Tabela 13

Zmiana stężenia kreatyniny i potasu w surowicy oraz wskaźnika filtracji kłębuszkowej po 7 dniach od włączenia leczenia

PARAMETR	A* - A (Δ)	B* - B (Δ)	p
eGFR CKD-EPI [ml/min]	2,43 ± 2,38	1,47 ± 1,54	NS (p=0,57)
Scr [mg/dl]	- 0,03 ± 0,05	- 0,04 ± 0,04	NS (p=0,81)
Stężenie potasu w surowicy krwi [mmol/L]	0,32 ± 0,08	0,36 ± 0,06	NS (p=0,60)

Dane wyrażono jako średnia ± standardowy błąd pomiaru (SEM)

NS - różnica nieistotna statystycznie

p - poziom istotności statystycznej (wyznaczony testem t – Studenta dla prób zależnych)

Stwierdzono znamienne statystycznie wzrost stężenia potasu w surowicy krwi pomiędzy wartościami uzyskanymi przed włączeniem oraz po tygodniu stosowania każdej

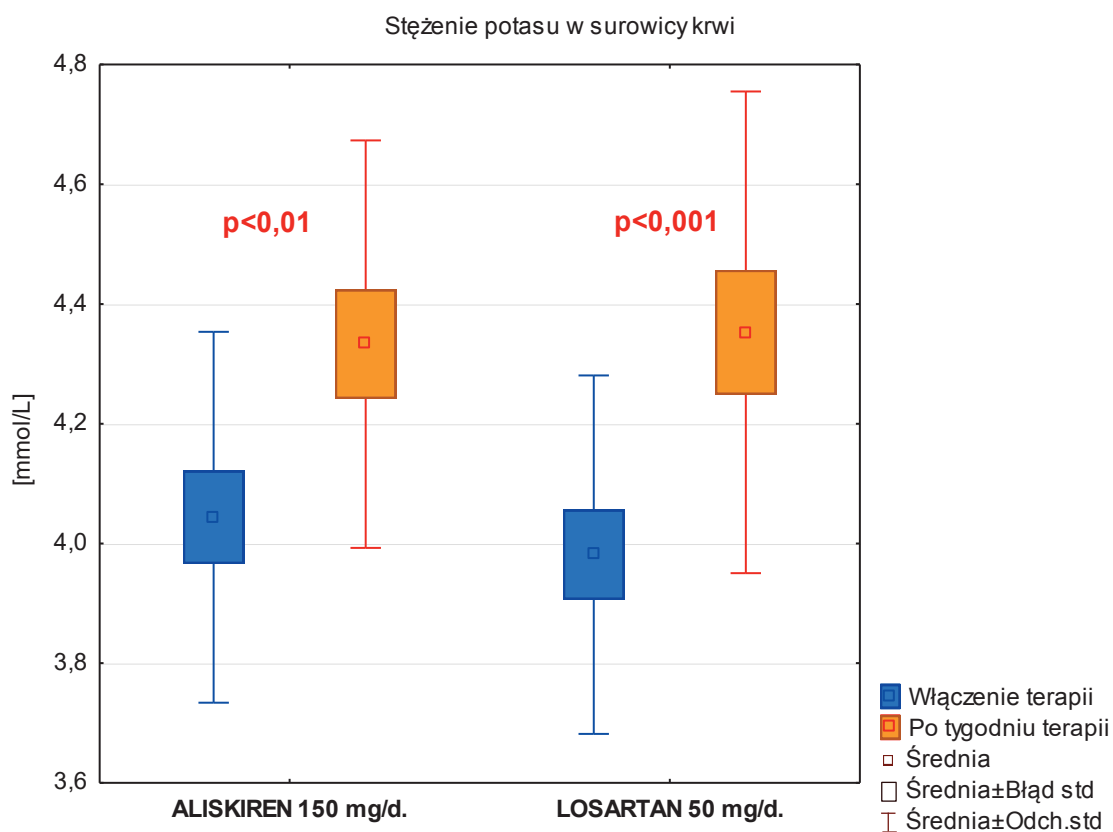
aktywnej terapii (odpowiednio: w przypadku aliskirenu $p<0,01$, jak i losartanu $p<0,001$), co obrazuje rycina 11A. oraz tabela 12.

Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic w Scr oraz eGFR pomiędzy wartościami uzyskanymi na etapie włączenia oraz po tygodniu stosowania obu aktywnych terapii (rycina 12A. i 13A. oraz tabela 12). Nie stwierdzano również znamienności statystycznej dotyczącej różnic wartości (przed włączeniem leku i po tygodniu terapii) w zakresie stężenia potasu, kreatyniny w surowicy, ani eGFR ($p>0,05$) pomiędzy aliskirenem a losartanem, co przedstawiono na rycinach 11B., 12B., 13B. oraz w tabeli 13.

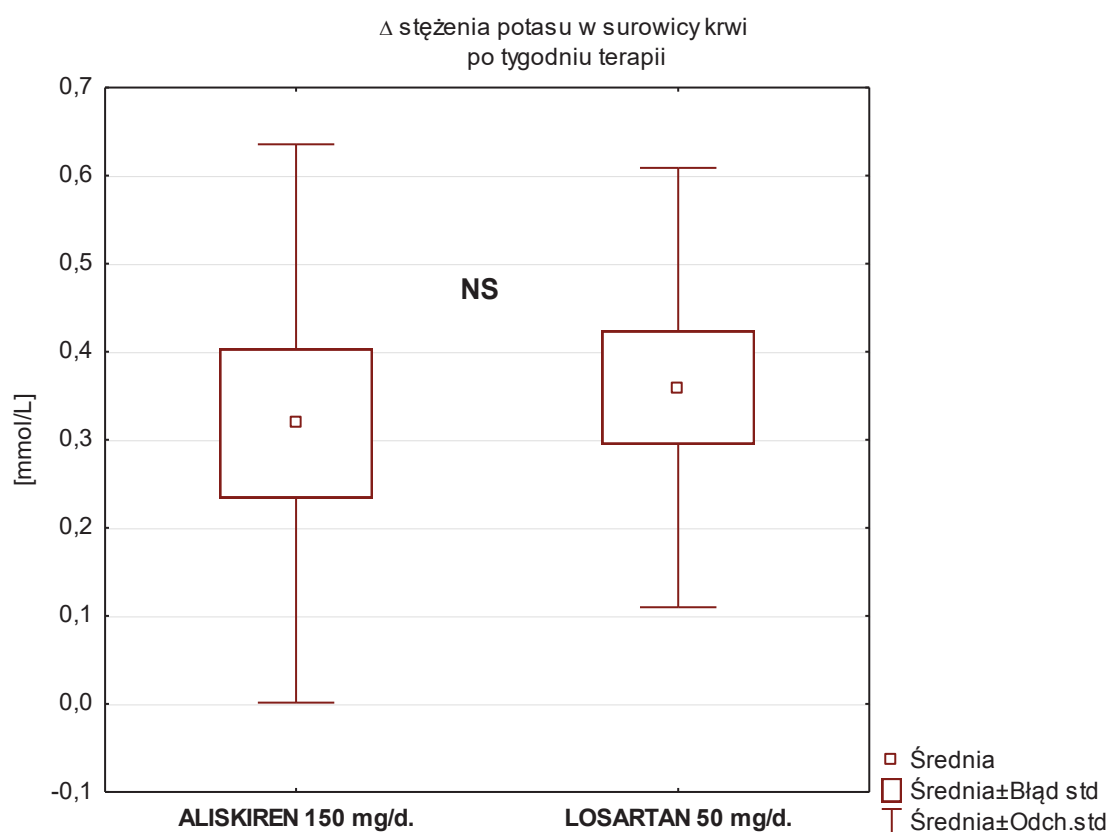
Rycina 11.

Zmiany stężenia potasu w surowicy krwi podczas aktywnych terapii aliskirenem i losartanem

Rycina 11A. Stężenie potasu w surowicy przed włączeniem i po tygodniu terapii



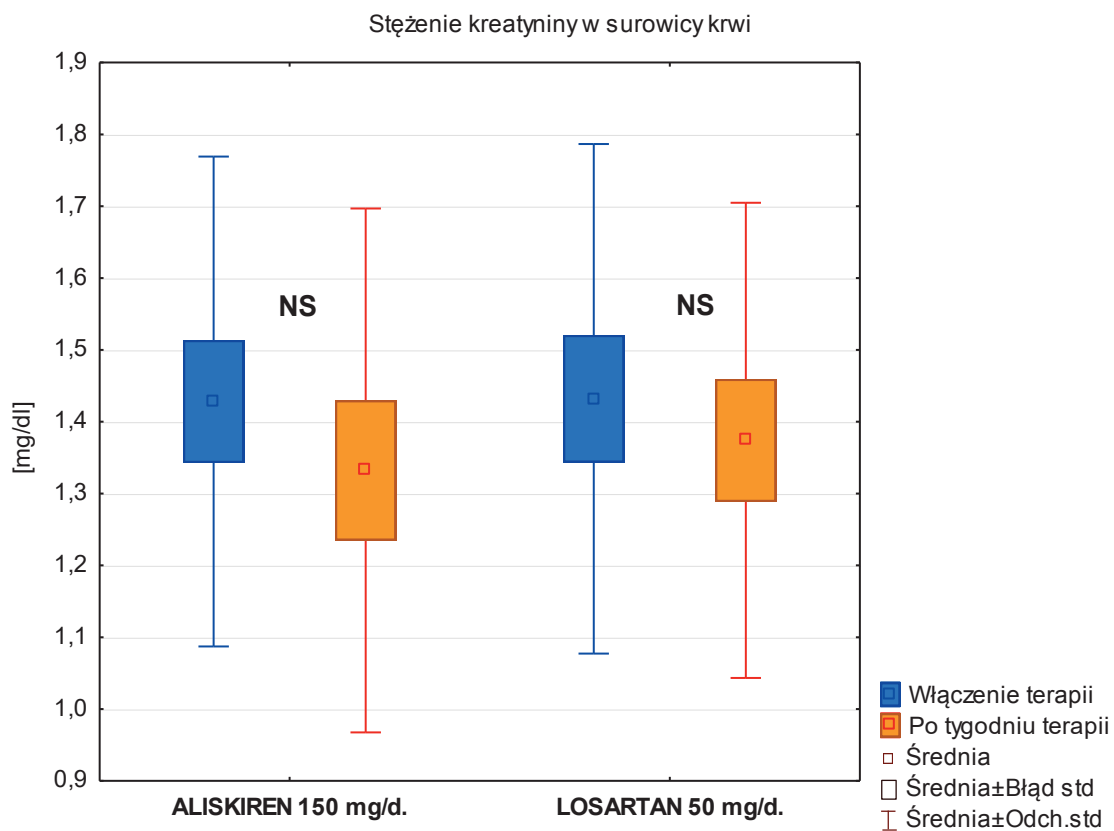
Rycina 11B. Zmiana stężenia potasu w surowicy przed włączeniem i po tygodniu terapii



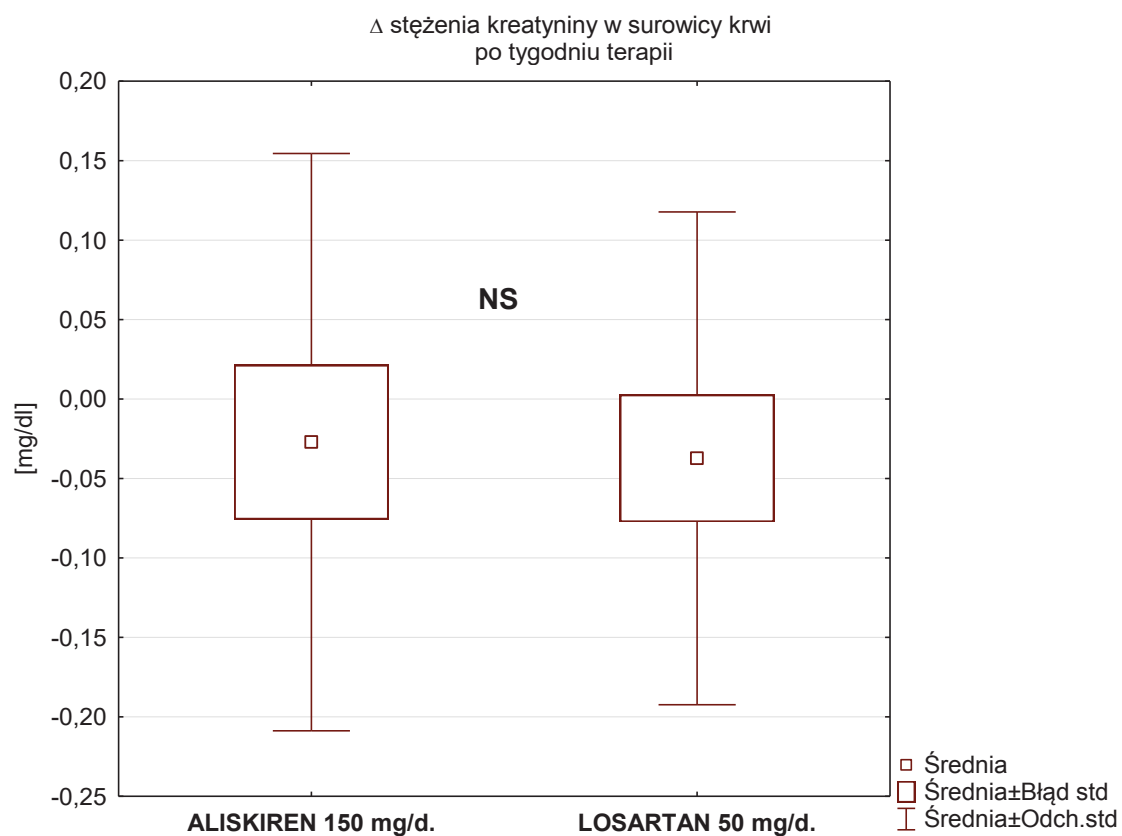
Rycina 12.

Zmiany Scr podczas terapii aliskirenem i losartanem

Rycina 12A. Scr przed włączeniem i po tygodniu terapii



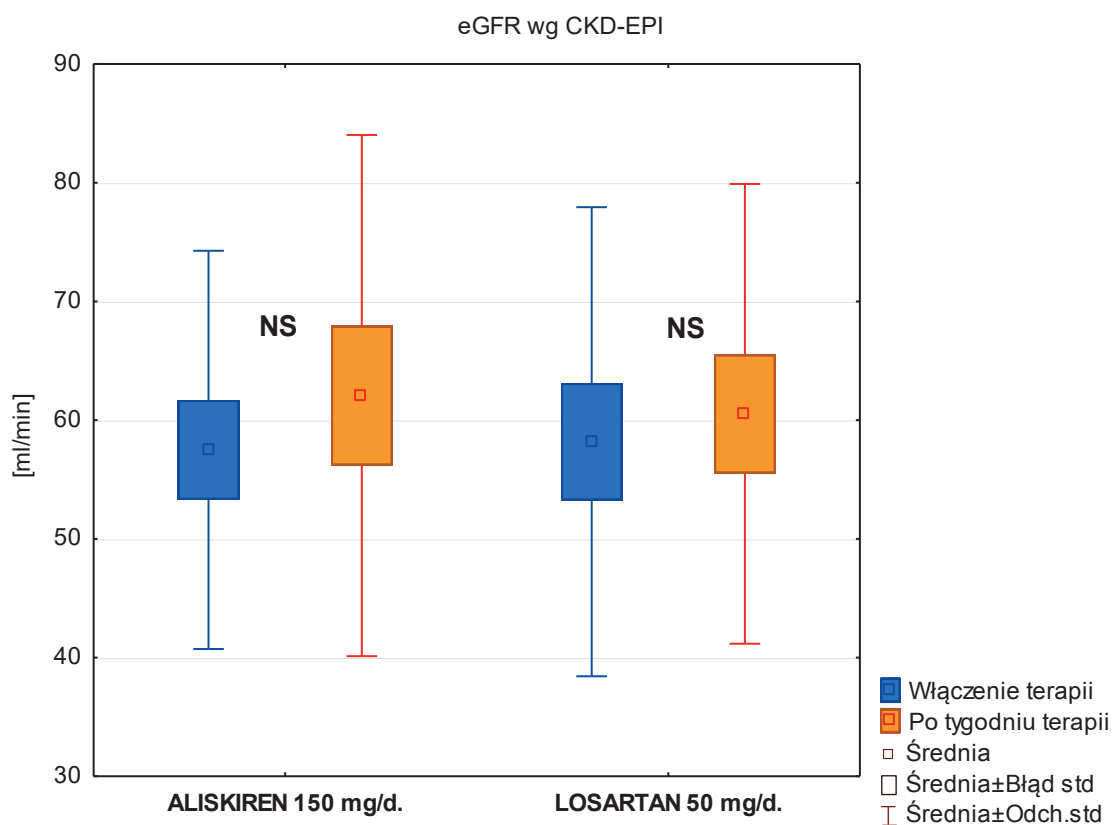
Rycina 12B. Zmiana Scr przed włączeniem i po tygodniu terapii



Wskaźnik filtracji kłębuszkowej (eGFR wg CKD-EPI) po tygodniu od rozpoczęcia leczenia aliskirenem i losartanem

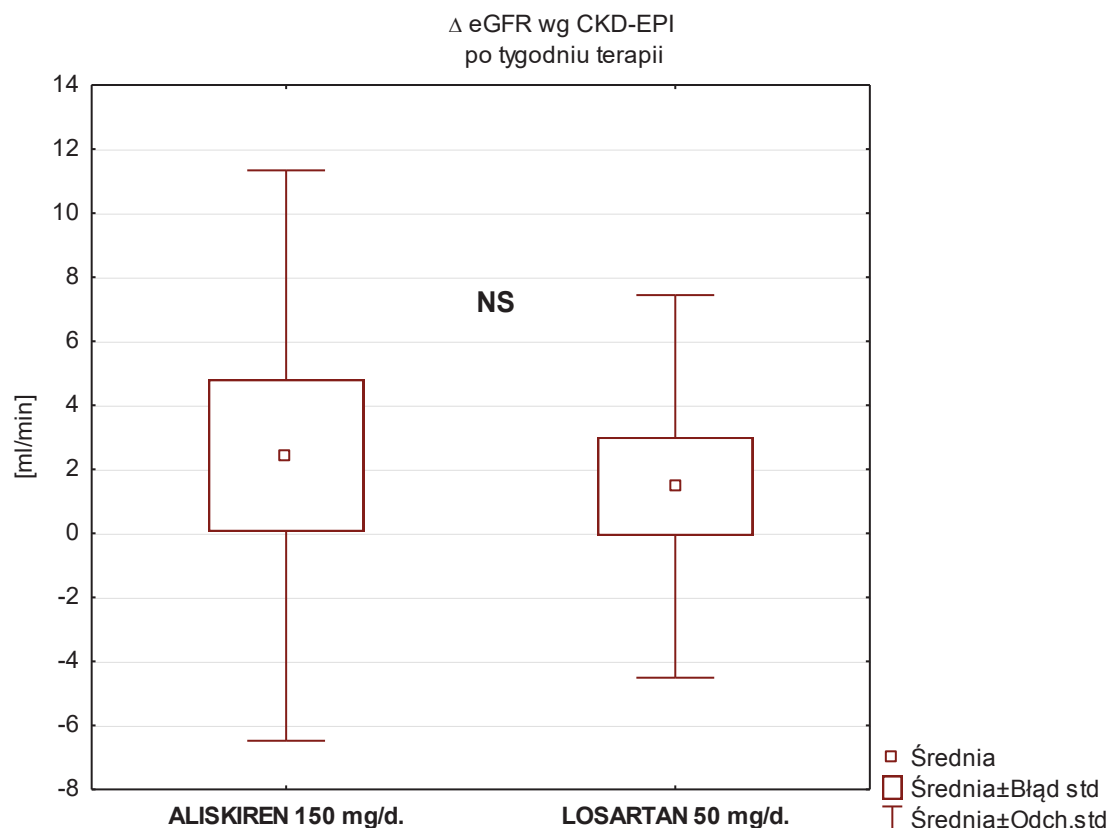
Rycina 13A.

Wartości eGFR wg CKD-EPI po tygodniu od rozpoczęcia terapii aliskirenem i losartanem



Rycina 13B.

Różnice wartości eGFR wg CKD-EPI po tygodniu od rozpoczęcia terapii aliskirenem i losartanem



Subiektywne objawy kliniczne

Jak wynikało z informacji uzyskanych z kwestionariusza występujących *de novo* działań niepożądanych, będących skutkiem ubocznym stosowanych terapii, zarówno aliskiren, jak i losartan były dobrze tolerowane przez pacjentów po TN. Działania niepożądane występujące *de novo* w trakcie stosowania powyższej terapii zgłaszane przez pacjentów, przedstawiono w tabeli 14. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy aktywnymi terapiami a placebo w częstości występowania działań niepożądanych (suchy kaszel, wysypka, świąd, zaburzenia żołądkowo-jelitowe, obrzęki, dysfunkcje seksualne, pogorszenie nastroju, bezsenność, koszmarne sny, uczucie zmęczenia).

Kwestionariusz działań niepożądanych wypełniano zarówno na etapie randomizacji, czyli przed włączeniem terapii oraz w ostatnim dniu trwania każdej aktywnej terapii i placebo. Umożliwiło to ścisłe raportowanie występowania działań niepożądanych *de novo* w efekcie

prowadzonej terapii i różnicowania ich np. z działaniami niepożądanymi przede wszystkim stosowanej immunosupresji, czyli ocenę rzeczywistej tolerancji badanego leku.

Tabela 14

Działania niepożądane występujące *de novo* zgłaszane przez pacjentów w trakcie przyjmowania badanych leków

RODZAJ OBJAWÓW	ALISKIREN (150 mg/d.)	LOSARTAN (50 mg/d.)	PLACEBO	p
Wysypka	1	0	0	NS (p=0,39)
Świąd	0	1	1	NS (p=0,61)
Zaburzenia żołądkowo-jelitowe	1	2	1	NS (p=0,61)
Kaszel (suchy)	0	2	1	NS (p=0,37)
Dysfunkcje seksualne	1	1	2	NS (p=0,61)
Pogorszenie nastroju	0	1	2	NS (p=0,22)
Bezsenność	0	0	1	NS (p=0,37)
Koszmarne sny	1	1	0	NS (p=0,61)
Zmęczenie	3	1	4	NS (p=0,25)
Obrzęki obwodowe	0	0	2	NS (p=0,37)

Wartości oznaczają liczbę chorych, u których wystąpił określony symptom podczas poszczegółnej fazy badania.

NS - różnica nieistotna statystycznie

p – poziom istotności statystycznej (wyznaczony za pomocą testu Q - Cochрана)

ROZDZIAŁ 5. DYSKUSJA

Nieustannie poszukuje się nowych i skuteczniejszych strategii farmakologicznej nefroprotekcji, aby uzyskać lepsze długoterminowe wyniki przeżycia nerki przeszczepionej, poprzez skuteczne spowalnianie postępu uszkodzenia graftu^{3,9,93,125,154}. Wydłużenie czasu przeżycia przeszczepionej nerki, a tym samym odsunięcie nawet o kilka lat konieczności powrotu na dializę, pozwala na dłuższe przeżycie chorych w lepszym komforcie^{10,15,18}.

Farmakologiczna blokada układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAs) jest dobrze udowodnionym postępowaniem nefroprotektynym w przypadku przewlekłej choroby nerek własnych (PChN) i chociaż w większości przypadków niemożliwe jest całkowite zatrzymanie progresji choroby do schyłkowej niewydolności nerek (ESRD), można ją jednak skutecznie opóźnić^{51,53,56,87,109}. W przypadku chorych po przeszczepieniu nerki (TN), dowody na skuteczność farmakologicznej nefroprotekcji są mniej liczne oraz oparte na badaniach obejmujących znacznie mniejsze populacje chorych. Biorąc jednak pod uwagę patomechanizm działania tych grup leków, można oczekiwać, że w następnych latach farmakologiczna blokada RAAs stanie się standardem przynajmniej dla niektórych chorych po transplantacji nerki^{59,68,118,128,140}. Postulować można, iż poprzez wczesną i wielokierunkową nefroprotekcję, zarówno farmakologiczną, jak i nefarmakologiczną, możliwe jest zmniejszenie ryzyka rozwoju oraz zwolnienie tempa progresji PDNP^{68,78,145,155,156}.

Standardem postępowania renoprotekcyjnego w PChN, zwłaszcza przy współistnieniu białkomoczu, jest obecnie stosowanie inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę I (IKA) lub blokerów receptora AT₁ dla angiotensyny II (ARA). Tego typu postępowanie nefroprotektynne ma pewne wady, które wynikają po części z działań niepożądanych, jak również z braku całkowitej blokady RAAs przy ich zastosowaniu^{54,56,67,86,88,157}. Próby wzmocnienia blokady RAAs poprzez użycie dwóch lub trzech leków o różnych punktach działania, związane były z nasileniem niebezpiecznych działań niepożądanych i nie są obecnie zalecane (dowodzą tego takie badania jak *ONTARGET*, *ALTITUDE* czy *VA-NEPHRON-D*^{52,65,89}), stąd też poszukiwanie innych metod skutecznej farmakologicznej nefroprotekcji przy zminimalizowaniu jej działań niekorzystnych. Wobec wprowadzenia na rynek nowej grupy leków, jakimi są bezpośrednie inhibitory reniny (aliskiren), pojawiły się pewne nadzieje w

tym aspekcie, co było powodem podjęcia przez nas próby oceny aliskirenu w aspekcie możliwości nefroprotektoryjnych i potencjalnych zagrożeń.

Problemy związane z niedostateczną blokadą RAAs w trakcie stosowania IKA lub ARA wynikają z kilku mechanizmów. Czynniki genetyczne i związany z tym polimorfizm genów oraz rasa są niemodyfikowalnymi czynnikami powodującymi osobniczą odpowiedź na zastosowane leki^{56,91,132,158}. Zaobserwowano również, że oporność na leczenie dotyczy przeważnie obu grup leków równocześnie, tak więc pacjenci, u których nie uzyskujemy zmniejszenia białkomoczu podczas terapii IKA, nie odpowiadają z reguły także na leczenie ARA¹⁵⁸. Ponadto, inną przyczyną braku w pełni satysfakcjonujących wyników leczenia może być fakt istnienia lokalnych (tkankowych) układów RAA, gdzie możliwość działania leków jest ograniczona⁹. Odrębnym problemem jest problem złożoności układu RAA i licznych sprzężeń zwrotnych występujących na różnych jego poziomach (rycina 2)^{50,159,160}. Stąd też blokowanie działania Ang II na poziomie receptorów AT₁, powoduje kompensacyjne zwiększenie syntezy reniny z równoczesnym wzrostem aktywności reninowej osocza (ARO), skutkujące tym, że ograniczona może zostać skuteczność tych leków (tabela 15)^{54,160}. Przedłużona terapia tymi lekami może skutkować gromadzeniem się Ang I oraz Ang II i kompetycyjnym przełamaniem blokady receptorów AT₁. Podobna sytuacja dotyczy IKA w odniesieniu do blokady enzymu konwertującego Ang I. W efekcie u znacznego odsetka pacjentów (nawet do 50%), długotrwale stosujących leki tych grup, obserwowane jest zmniejszenie siły ich działania po początkowo dobrej odpowiedzi terapeutycznej i stopniowy powrót stężenia Ang II i aldosteronu do wartości wyjściowych sprzed włączenia terapii antagonistą układu RAA (tzw. „unik aldosteronowy”; *ang. aldosterone escape phenomenon*)^{9,68,88,119,158}. W praktyce klinicznej może to oznaczać oporność na stosowany lek, przy czym większe znaczenie to ma w przypadku stosowania IKA aniżeli ARA^{55,73,109}. Stosowanie bezpośredniego inhibitora reniny – aliskirenu, w przeciwieństwie do innych leków blokujących RAAs nie powoduje „zjawiska ucieczki”, o czym szerzej w dalszej części dyskusji^{161,162}.

Tabela 15

Wpływ leków blokujących układ RAA na stężenie proreniny/reniny, aktywność reninową osocza (PRA) oraz stężenie angiotensyny I i II (Ang I i II)

Leki	Prorenina/Renina	PRA	Ang I	Ang II
Diuretyki	↑	↑	↑	↑
Beta-blokery	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓
ACEi	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	↓ ↓ ↓
ARA	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑
Aliskiren	↑ ↑ ↑	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓

Charakterystyka bezpośredniego inhibitora reniny (DRI) – aliskirenu

Aliskiren jest pierwszym i jak dotychczas jedynym przedstawicielem bezpośrednich inhibitorów reniny, który udało się opracować w stabilnej, aktywnej postaci przy podaniu doustnym w 2003 roku. Został on zarejestrowany oraz dopuszczony przez FDA (*Food and Drug Administration*) w 2007 roku do stosowania w Stanach Zjednoczonych (*Tekturna®*), a następnie w 2008 roku również przez Komisję Europejską (*Rasilez®*) do leczenia NT w monoterapii, jak i terapii skojarzonej z innymi lekami hipotensyjnymi, w tym innymi inhibitorami układu RAA^{72,91,111,163}. Lek ten wykazuje się wysoką skutecznością hipotensyjną, porównywalną z blokerami kanału wapniowego (CCB), IKA czy też ARA w równoważnych dawkach^{2,161,164,165,166}. Dawka 300 mg leku charakteryzuje się skutecznością podobną do 320 mg walsartanu, 100 mg losartanu, czy też 40 mg lisinoprilu^{7,9,74,159,167}. Podwyższenie dawki leku do 600 mg/dobę wiązało się z istotnym zwiększeniem ryzyka działań niepożądanych przy niewielkiej poprawie efektu hipotensyjnego^{7,74,146}. W niniejszym badaniu wykazano, że w populacji chorych po TN, aliskiren w dawce 150 mg/dobę wykazuje podobną siłę hipotensyjną jak losartan w dawce dobowej 50 mg. Ocena ciśnienia dokonana została za pomocą 24 godzinnego ambulatoryjnego pomiaru (ABPM) przeprowadzonego w trakcie każdego etapu badania i porównana z pomiarami ciśnienia w gabinecie. Podobne dane uzyskano również w innych badaniach z naszego ośrodka, przeprowadzonych u chorych z PChN w przebiegu nie-cukrzycowej choroby nerek¹¹⁵.

Właściwości farmakokinetyczne oraz farmakodynamiczne aliskirenu predysponują go do stosowania u chorych po przeszczepieniu nerki. Jest to lek o długim okresie półtrwania

wynoszącym 24-36 godzin, przez co zastosowanie jednorazowej dawki aliskirenu zapewnia dobrą kontrolę ciśnienia przez całą dobę^{160,168,169}, a metabolizm leku poprzez izoenzym CYP 3A4 cytochromu P450 dotyczy niewielkiego odsetka podanej dawki^{162,165}. Dodatkową zaletą leku u chorych z upośledzeniem funkcji nerek jest droga wydalania, bowiem w ponad 90% odbywa się to drogą żółci w postaci niezmienionej, natomiast mniej niż 1% dawki leku jest wydalana przez nerki. Właściwości te są bardzo korzystne przy polipragmazji z użyciem leków, w których metabolizm z udziałem cytochromu P450 odgrywa istotną rolę^{9,56,75,162,165,170}. Zarówno wchłanianie jelitowe aliskirenu, jak i jego wydalanie w większości z żółcią odbywa się z udziałem glikoproteiny P, która odpowiada też za stosunkowo niską biodostępność aliskirenu⁵⁶. Mimo, iż DRI jest substratem dla glikoproteiny P, jednak nie wpływa na jej aktywność⁷. Pamiętać należy, że silne induktory glikoproteiny P (dziurawiec, ryfampicyna) mogą zmniejszać, z kolei silne inhibitory (cyklosporyna A, chinidyna, werapamil) mogą zwiększać stężenie aliskirenu we krwi^{56,74,165}. Ostrożność należy zachować także podczas równoległego przyjmowania atorwastatyny, lowastatyny, atenololu, leków przeciwwgrzybiczych pochodnych imidazolu, amiodaronu czy makrolidów^{56,80,109,162}.

Badania moje oparłam na porównaniu aliskirenu z losartanem, bowiem lek ten jest dobrze poznanym przedstawicielem grupy antagonistów receptora AT₁ dla angiotensyny II i od czasu jego rejestracji (1995 rok) opublikowano liczne badania wykazujące nefroprotektoryjne właściwości tego leku u chorych z PChN. Dostępne są również badania wskazujące, iż może on być też opcją terapeutyczną dla pacjentów po przeszczepieniu nerki^{118,140,171,172,173}. Na wybór losartanu miały też wpływ nasze wcześniejsze doświadczenia związane z oceną skuteczności nefroprotektoryjnej tego leku^{125,151,156,174,175}. Blokery RAAs przez długi okres czasu nie zyskiwały szerokiej akceptacji w leczeniu nadciśnienia tętniczego u biorców nerek z powodu potencjalnego zmniejszenia przepływu krwi przez nerki/kłębuszki i tym samym filtracji kłębuszkowej, co może być związane ze zwężeniem tętnicy nerki przeszczepionej, czy też równoczesnym stosowaniem cyklosporyny^{28,29,59,125,176}. Wobec tego, mając na uwadze bezpieczeństwo włączanej w trakcie badania terapii, poza głównymi wizytami kontrolnymi przeprowadzono również tzw. „wizyty bezpieczeństwa” szczegółowo omówione w rozdziale 3.

Aliskiren hamuje powstawanie Ang II i aldosteronu silniej, aniżeli ma to miejsce podczas terapii ARA, co dowiedziono w dużych badaniach *AVOID*, *ALLAY* czy *ALOFT*^{114,177,178}. Wobec tego, że aliskiren działa na układ RAA już na pierwszym jego etapie, hamując katalityczne

właściwości reniny, blokada ta wydaje się być bardziej kompletna. Jak wynika z ryciny 2 i tabeli 15, blokada RAAs przez ARA i/lub DRI powoduje w konsekwencji hamowanie syntezy aldosteronu i poprzez sprzężenie zwrotne dochodzi do wzrostu stężenia proreniny i reniny w osoczu (*ang. plasma prorenin concentration – PPC; plasma renin concentration – PRC*)^{7,53,55,165}. Wzrost PPC/PRC jest więc mechanizmem wyrównawczym uruchamianym wskutek zmniejszenia aktywności reninowej osocza (ARO; *ang. plasma renin activity – PRA*) i poziomu Ang II. Aliskiren, w odróżnieniu od innych blokerów układu RAA, znacząco zmniejsza ARO w stopniu zależnym od zastosowanej dawki leku, stąd też supresja układu RAA z udziałem aliskirenu może być pełniejsza i bardziej efektywna^{56,160,161}. Należy jednak pamiętać, że nadal nie udaje się całkowicie zablokować wszystkich niekorzystnych skutków aktywacji układu RAA. Biorąc pod uwagę te dobrze znane informacje, w naszym badaniu nie oznaczaliśmy PPC/ PRC, ani też PRA.

Kolejną cechą mogącą wskazywać na korzystne właściwości aliskirenu, jest jego duża objętość dystrybucji, a tym samym wysokie stężenia leku w przestrzeni pozanaczyniowej i tkankach^{162,179}. Czyni to lek potencjalnie korzystniejszym w hamowaniu lokalnej aktywności układu RAA w porównaniu z innymi blokerami układu RAA, a hamowanie wzmożonej ekspresji wewnątrznerkowego układu RAA może być istotnym elementem nefroprotekcji w trakcie terapii tym lekiem. Wykazano, że po zaprzestaniu terapii aliskirenem nie dochodzi do tzw. „efektu z odbicia”, czyli występowania działań niepożądanych po nagłym odstawieniu leku, co niewątpliwie jest jego kolejną pozytywną cechą^{160,165}.

Wszystkie powyższe właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne aliskirenu były decydującymi czynnikami naszego zainteresowania tym lekiem w kontekście jego potencjalnych właściwości nefroprotektoryjnych u chorych po przeszczepieniu nerki.

Liczba przeprowadzonych badań oceniających wpływ farmakologicznej blokady układu RAA w przypadku chorych po TN jest wyraźnie mniejsza w porównaniu z badaniami w populacji chorych z PChN, a zatem skuteczność postępowania nefroprotektoryjnego poprzez blokowanie RAAs jest w tej grupie chorych słabiej udokumentowana^{3,53}. Należy również zauważyć, że wnioski z dotychczasowych badań nie są jednoznaczne, co uniemożliwia w chwili obecnej wydanie zaleceń o dużej sile wiarygodności w tej grupie chorych^{9,34,139,171,180}. Mając na uwadze mechanizm działania nefroprotektoryjnego inhibitorów RAAs w PChN, można przypuszczać, że wykazują one zbliżone właściwości u chorych po TN¹⁰⁹. Trzeba też podkreślić, że istnieje dość duża ilość badań wskazujących na korzystny efekt blokady układu

RAA w zmniejszaniu białkomoczu i innych surogatów hamowania progresji PDNP. Natomiast dotychczasowe informacje dotyczące redukcji białkomoczu przy stosowaniu aliskirenu dotyczyły prawie wyłącznie chorych z PChN w przebiegu cukrzycy i nefropatii cukrzycowych.

Doświadczenia związane z farmakologiczną blokadą układu RAA w PChN mają ponad trzydziestoletnią historię i stosowanie IKA i/lub sartanów (ARA) jest bez wątpienia najlepiej udokumentowaną i tym samym zalecaną metodą współczesnej nefroprotekcji^{6,108,181}. Powyższe zalecenia powstały w oparciu o wyniki dużych wieloośrodkowych badań takich jak np. **RENAAL**, w którym potwierdzono właściwości kardioneфроprotektcyjne losartanu w grupie chorych z białkomoczem (UACR ≥ 300 mg/g kreatyniny) w przebiegu cukrzycowej choroby nerek (CChN) bez wcześniejszych chorób układu sercowo-naczyniowego¹⁸². Losartan znamienne redukował ryzyko wystąpienia złożonego punktu końcowego, jakim było podwojenie stężenia kreatyniny, 50% redukcja klirensu kreatyniny, wystąpienie schyłkowej niewydolności nerek (ESRD) czy też śmierć pacjenta z jakiegokolwiek przyczyny. Ponadto wykazano redukcję ryzyka wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych u chorych przyjmujących sartan. Warto też zaznaczyć, że losartan istotnie obniżał wielkość albuminurii (35% w stosunku do wartości wyjściowych) i efekt ten był niezależny od obniżenia ciśnienia tętniczego krwi. Większość istotnych dla tego zagadnienia badań zostało przedstawionych w tabeli 3, umieszczonej we wstępie pracy. Wyniki większości randomizowanych badań wskazują, że w nefropatiach przebiegających z białkomoczem o podłożu nie-cukrzycowym, zastosowanie IKA i/lub sartanów (ARA) także prowadzi do zmniejszenia tempa progresji niewydolności nerek, a uzyskany efekt jest proporcjonalny do stopnia redukcji białkomoczu i jest w dużej mierze niezależny od obniżenia ciśnienia tętniczego krwi^{66,151,174,183,184,185}.

Wybór w moim badaniu albuminurii jako wskaźnika uszkodzenia nerek oparty był na istotnym znaczeniu białkomoczu w uszkodzeniu nerki przeszczepionej i zwiększonej śmiertelności chorych po TN^{99,101,103}. Wykazano, że białkomocz jest silnym i niezależnym czynnikiem ryzyka utraty graftu¹⁰⁷. Odwrotna zależność między białkomoczem a przeżyciem przeszczepu została wykazana również u pacjentów z niskim białkomoczem (0,150-0,2 g/dobę)¹⁰². Wskaźnikiem wczesnego uszkodzenia nerek, który często poprzedza wystąpienie jawnego białkomoczu, jest albuminuria oceniana przy użyciu UACR, który jest obecnie rekomendowany do jej oceny¹⁸⁶. Ponadto jest to jeden z dobrych i łatwych do oznaczenia wskaźników skuteczności prowadzonego leczenia nefroprotektynego. Na potrzebę wykonywania randomizowanych badań klinicznych

zwłaszcza związanych ze stosowaniem blokady układu RAA, u chorych po TN z albuminurią i białkomoczem wskazuje w swojej pracy Halimi J.M¹²³. Według autora tej publikacji istotny jest fakt, że przewlekłe uszkodzenie nerki przeszczepionej (IF/TA) może wystąpić już po 3 miesiącach od przeszczepienia i wskazuje, iż wcześniej włączone leczenie redukujące albuminurię jest niezbędne, aby poprawić czynność graftu w obserwacji długoterminowej oraz polepszyć ogólne wyniki transplantacji.

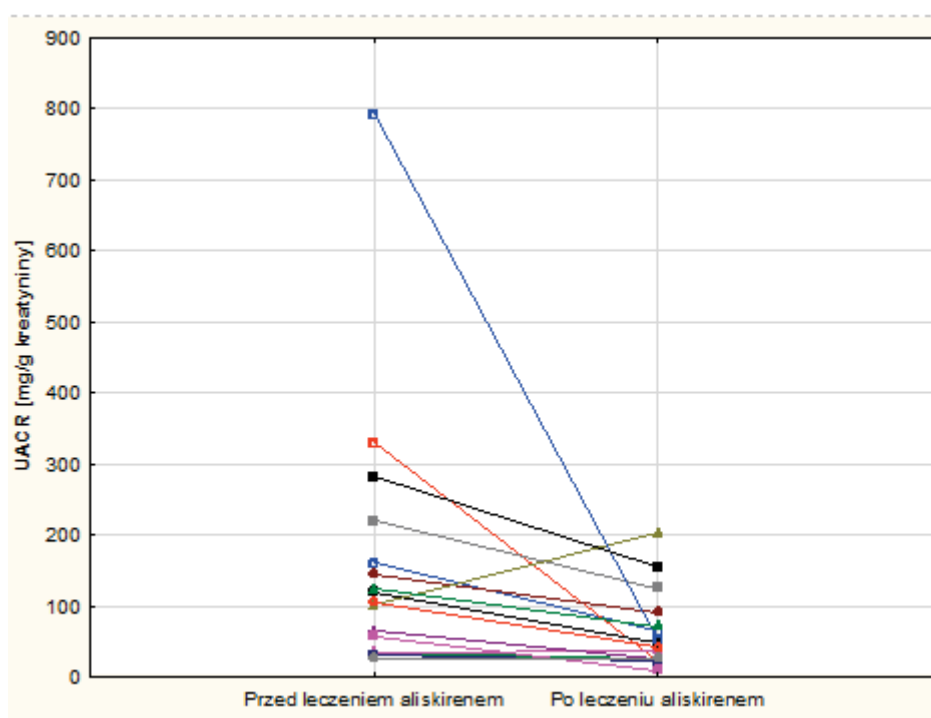
Progresję uszkodzenia nerek w przebiegu białkomoczu tłumaczy kilka teorii, są to mianowicie: teoria hiperfiltracji Brennera, teoria toksyczności białkomoczu Remuzziego oraz teoria uszkodzenia podocyta Kriza^{7,187,188}. Teoria hiperfiltracji Brennera zakłada, że każdy ubytek nefronów prowadzi do hiperfiltracji w pozostałych kłębuszkach, co doprowadza w konsekwencji do postępującego stwardnienia kłębuszków i rozwoju bądź progresji białkomoczu^{7,189}.

Teoria toksyczności białkomoczu opracowana przez grupę Remuzziego, tłumaczy zależność pomiędzy wielkością białkomoczu i szybkością postępu PChN, co wskazuje na istotną rolę zmniejszania białkomoczu w leczeniu nefroprotektoryjnym^{7,190}. Teoria ta opiera się na założeniu, że filtrowane w kłębuszkach nerkowych białko ulega resorpcji w cewce proksymalnej i zostaje zmetabolizowane. Po przekroczeniu jednak pewnej wartości progowej aktywności i efektywności tego procesu, nie wszystkie przefiltrowane cząsteczki białka ulegają zmetabolizowaniu. Pozostałe cząsteczki białka wywierają miejscowe działanie toksyczne i wywołują odczyn zapalny w tkance śródmiąższowej, powodując dalsze niszczenie nerek. Jak udowodniono, przewlekłe zmiany zapalne w tkance śródmiąższowej są stałym i dominującym objawem mikroskopowym w PChN, niezależnie od jej etiologii^{7,36,109,191}. Wyniki wielu badań wykazały, że zmniejszenie białkomoczu za pomocą farmakologicznej blokady układu RAA prowadzi do zwolnienia progresji PChN. Dotyczy to zarówno chorych z nefropatią cukrzycową, jak i pacjentów z PChN u podłoża, którego nie leży cukrzyca^{7,158}. Ustalono również, że utrzymujący się stały (powyżej 3 miesięcy) i późny (po 3 miesiącach od przeszczepienia nerki) białkomocz jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym dla długotrwałego przeżycia graftu^{103,106}. Białkomocz może być spowodowany uszkodzeniem kłębuszków nerkowych w przebiegu nawrotu choroby podstawowej, glomerulopatii potransplacyjnej, uszkodzenia wywołanego nadciśnieniem czy też IF/TA⁴¹. Udowodniono też istotny związek pomiędzy nasileniem białkomoczu a zaawansowaniem zmian w biopsji nerki przeszczepionej⁴¹. Dlatego tak istotne jest leczenie zmniejszające

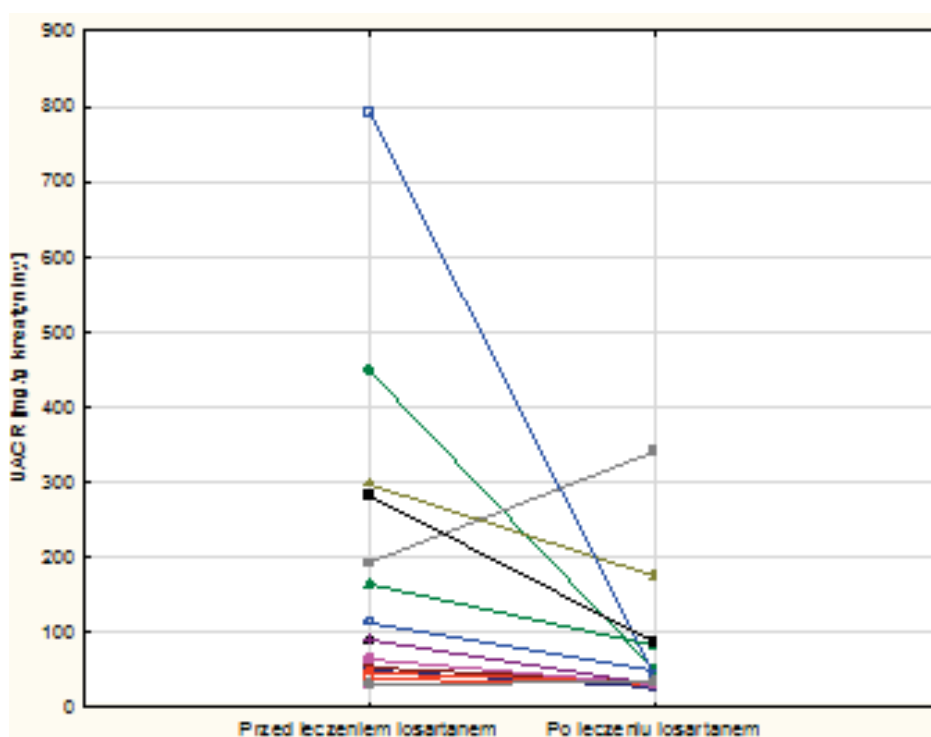
białkomocz, ponieważ niezależnie od choroby podstawowej, zmniejszając ekspozycję nefronów na działanie szkodliwe białkomoczu, postępowanie takie wywiera działanie nefroprotekcyjne i spowalnia progresję choroby¹⁹².

W przeprowadzonym badaniu wykazałam, że wśród pacjentów po TN terapia aliskirenem w dawce 150 mg/dobę jest równie skuteczna w redukcji albuminurii, jak losartan w dawce 50 mg/dobę. Albuminuria podczas obu aktywnych terapii inhibitorami RAAs obniżyła się o 65% w porównaniu do placebo (ze 182,0 mg/g kreatyniny do 63,3 mg/g kreatyniny po leczeniu aliskirenem i vs 64,8 mg/g kreatyniny po terapii losartanem; analiza *post-hoc* w przypadku obu terapii względem placebo: $p < 0,05$). Natomiast nie wykazano znamiennych statystycznie różnic porównując te dwa leki w tym zakresie. Wykazano obniżenie albuminurii u 10 chorych po terapii aliskirenem oraz u 11 chorych po zastosowaniu losartanu (rycina 14 i 15).

Rycina 14. Indywidualny profil UACR po terapii aliskirenem



Rycina 15. Indywidualny profil UACR po terapii losartanem



W trakcie obu aktywnych terapii (aliskirenem i losartanem) uzyskano większe obniżenie ciśnienia tętniczego krwi, aniżeli po placebo, co z pewnością w perspektywie dłuższego czasu ma korzystne działanie na nerkę przeszczepioną. W niniejszym badaniu, w oparciu o test istotności współczynnika korelacji liniowej Pearsona potwierdzonej wynikami analizy regresji wielorakiej, nie wykazano jednak korelacji pomiędzy zmianą ciśnienia tętniczego a zmniejszeniem UACR. Świadczy to zatem o tym, że obniżenie albuminurii za pośrednictwem aliskirenu lub losartanu jest tylko częściowo zależne od redukcji systemowego ciśnienia tętniczego krwi, a dodatkowo wynika ze specyficznych właściwości leków blokujących RAAs. Zatem należy przypuszczać, że korzystne efekty aliskirenu na nerkę przeszczepioną będą wypadkową działania obniżającego białkomocz i ciśnienie tętnicze.

Według mojej wiedzy, przeprowadzone przeze mnie badanie było pierwszym i jak dotychczas jedynym, w którym analizowano efekty nerkowe aliskirenu w populacji chorych po TN. Było ono podstawą do publikacji zatytułowanej „*Aliskiren reduces albuminuria after kidney transplantation*” opublikowanej w *Acta Biochimica Polonica*¹⁹³. Niezależność redukcji albuminurii od stopnia obniżenia ciśnienia tętniczego potwierdzają również wyniki innego badania przeprowadzonego w naszym ośrodku, porównującego efekty losartanu i karwedilolu z placebo, w grupie stabilnych chorych po przeszczepieniu nerki. W badaniu tym

wykazano istotne zmniejszenie albuminurii (o 44%) u chorych leczonych losartanem w porównaniu z placebo i karwedilolem¹⁵⁶.

W modelach eksperymentalnych przeszczepionej nerki (model szczurzy) uzyskano wyniki rozbieżne w zakresie renoprotekcyjnych właściwości aliskirenu. Rusai i wsp. nie stwierdzili korzystnego wpływu terapii aliskirenem na białkomocz i funkcję nerki, jak również poprawy w zakresie zmian histopatologicznych w nerce przeszczepionej¹²⁷. Przeciwnie wyniki uzyskała Al.-Habri i wsp., którzy wykazali, że aliskiren może osłabiać niekorzystne zmiany wywołane takrolimusem, a nawet uzyskano poprawę obrazu ultrasonograficznego i histopatologicznego nerki przeszczepionej w grupie zwierząt otrzymujących lek¹⁹⁴.

Badania nad zastosowaniem aliskirenu u chorych z białkomoczem, najczęściej dotyczyły chorych z PChN w przebiegu cukrzycowej choroby nerek we wczesnych stadiach (1-3). Jednym z istotniejszych badań w tej grupie pacjentów było wieloośrodkowe, randomizowane badanie przeprowadzone przez Parvinga H.H. i wsp. pod akronimem **AVOID** (*The Aliskiren in the Evaluation of Proteinuria in Diabetes trial*) w grupie 599 chorych¹¹⁴. W badaniu tym wykazano, że dołączenie aliskirenu do standardowego leczenia stosowanego w nefropatii cukrzycowej, którym w tym przypadku był losartan w dawce 100 mg/dobę, skuteczniej zmniejsza albuminurię ($p=0,002$). Wykazano również, że w tej grupie chorych dawka aliskirenu 300 mg jest skuteczniejsza aniżeli 150 mg/dobę w redukcji białkomoczu (odpowiednio o 20% i 11% w porównaniu z placebo; $p<0,001$). Redukcja albuminurii $\geq 50\%$ wartości wyjściowej została osiągnięta u ponad 24,7% pacjentów na terapii łączonej aliskirenem i losartanem, natomiast u 12,5% chorych otrzymujących monoterapię losartanem ($p<0,0005$). Tempo spadku filtracji kłębuszkowej było porównywalne, wynosiło bowiem 3,8 ml/min/1.73 m² w grupie placebo vs 2,4 ml/min/1.73 m² w grupie z aliskirenem ($p=0,07$), jednak z tendencją do wolniejszego ubytku przy stosowaniu aliskirenu. Terapia łączona była dobrze tolerowana przez pacjentów, a liczba zanotowanych działań niepożądanych była podobna w obu grupach. Jedynie liczba incydentów hiperkaliemii powyżej 6 mmol/L była wyższa w grupie z terapią łączoną w porównaniu z grupą stosującą placebo (odpowiednio: 14/201 vs 5/200, tj. 4,7% vs 1,7%). Nie stwierdzono klinicznych konsekwencji tego stanu, jak również żaden z tej grupy pacjentów nie wymagał leczenia nerkozastępczego z tego powodu.

Jednym z pierwszych opublikowanych badań, w którym oceniano efektywność nefroprotekcyjną, tolerancję i bezpieczeństwo stosowania aliskirenu u chorych z nie-

cukrzycowym białkomoczem było badanie przeprowadzone przez zespół Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych GUMed¹¹⁵. W badaniu tym bezpośrednio porównano aliskiren z perindopilem (badanie typu *head-to-head*) i miało ono podobną konstrukcję metodologiczną, jakiej użyto w niniejszej pracy (randomizowane, podwójnie ślepej próby, typu *cross-over*). Warto zwrócić uwagę, że w tym badaniu jednym z kryteriów włączenia była PChN w stadium 1-3 (tj. eGFR powyżej 30 ml/min/1.73 m²) oraz stabilny białkomocz powyżej 500 mg/dobę. Terapia aliskirenem w dawce 150 mg/dobę miała zbliżoną skuteczność w redukcji białkomoczu do perindoprilu w dawce 10 mg/dobę (23% i 25,1% odpowiednio; $p < 0,05$). W przypadku aliskirenu obniżenie białkomoczu było zależne od dawki stosowanych leków. Zwiększenie jej ze 150 do 300 mg/dobę spowodowało dalszą redukcję białkomoczu o 13% i łącznie wynosiła ona 36% vs placebo ($p < 0,001$). Zarówno aliskiren, jak i perindopril były dobrze tolerowane przez chorych i podczas badania nie odnotowano żadnych istotnych działań niepożądanych. Pośród dodatkowych celów badania była ocena osocznego stężenia reniny (PRC). Zaobserwowano znamienne statystycznie wzrost PRC, zarówno podczas terapii perindopilem 10 mg (o 628,5%), jak i aliskirenem 300 mg (o 1132%) w porównaniu z placebo (leczenie vs placebo oraz aliskiren vs perindopril $p < 0,001$). Leczenie aliskirenem (300 mg), spowodowało także statystycznie istotny wzrost stężenia proreniny (PPC) w osoczu krwi w porównaniu do placebo ($p < 0,01$), natomiast istotnych różnic PPC nie obserwowano w trakcie terapii perindopilem 10 mg/dobę. Możliwe implikacje tych zmian w odniesieniu do włóknienia nerek przedstawiono w dalszej części rozdziału. Potwierdzono też wyniki wcześniejszych badań (w tym rejestracyjnych), w których aliskiren okazał się być skutecznym lekiem hipotensyjnym, a największą redukcję ciśnienia tętniczego stwierdzono w trakcie stosowania leku w dawce 300 mg (względem perindoprilu w dawce 10 mg $p < 0,05$ oraz względem placebo $p < 0,001$)¹¹⁵. Większe obniżenie ciśnienia po dawce 300 mg leku na dobę może tłumaczyć częściowo skuteczniejszą redukcję białkomoczu w trakcie tej terapii.

Również badania przeprowadzone u chorych po przeszczepieniu nerki wskazywać mogą na korzystny efekt stosowania aliskirenu. Wyniki prospektywnego badania obserwacyjnego ze średnim okresem obserwacji 11 miesięcy, oceniającego skuteczność i bezpieczeństwo efektów terapii skojarzonej wysoką dawką sartanu z DRI stosowanych u pacjentów po TN z jawnym białkomoczem (1,0-3,5 g/24 godz.) były w tym aspekcie dosyć obiecujące¹⁹⁵. W tym wypadku aliskiren został dołączony do ARA z powodu niewystarczającej

odpowiedzi terapeutycznej na stosowaną monoterapię tą grupą leków. Po 3 miesiącach stosowania podwójnej blokady układu RAA z aliskirenem odnotowano znaczące zmniejszenie białkomoczu (40%), a po 6 miesiącach spadek o 60% od wartości wyjściowych (1,89 do 0,82 g/24 godz.). Nie odnotowano pogorszenia funkcji nerki przeszczepionej w okresie obserwacji (stabilny średni eGFR), nie obserwowano też hiperkalemii. Tylko u jednego pacjenta konieczne było przerwanie terapii skojarzonej na skutek objawów związanych ze spadkiem ciśnienia tętniczego. Badanie to może wskazywać korzyści ze stosowania aliskirenu u wybranych pacjentów po TN.

Nowe spojrzenie na stosowanie podwójnej blokady układu RAA z zastosowaniem aliskirenu rzuciły wyniki badania **ALTITUDE** (*The Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardiovascular and Renal Disease Endpoints Trial*)¹⁹⁶. W tym dużym (8606 chorych) wieloośrodkowym randomizowanym, podwójnie zaślepionym badaniu, wskazano na zwiększone ryzyko występowania poważnych zdarzeń niepożądanych (SAE; ang. *Serious Adverse Event*) w grupie pacjentów otrzymujących aliskiren wraz z IKA lub ARA (tzw. podwójna blokada układu RAA) w porównaniu do monoterapii inhibitorem osi RAA (IKA lub ARA). W trakcie terapii skojarzonej częściej raportowano hiperkaliemię (36,9 vs 27,1% w trakcie monoterapii), w tym istotną klinicznie ≥ 6 mmol/L (11,2 vs 7,2%, odpowiednio; $p < 0,001$) i wystąpienie poważnych powikłań nerkowych, w tym ostrą niewydolność nerek (4,7 vs 3,3%). Ponadto w grupie tej częściej stwierdzano udary mózgu (2,6 vs 2,0%) oraz epizody hipotensji (18,4 vs 14,6%; $p < 0,001$). Było to jedno z istotniejszych badań na podstawie, których FDA wydało decyzję o przeciwwskazaniach do stosowania aliskirenu w połączeniu z innymi inhibitorami układu RAA u chorych z cukrzycą oraz zalecono też unikanie takiego połączenia u chorych z uszkodzeniem nerek (eGFR < 60 ml/min). Podobne zalecenia odnośnie chorych z CChN w 2014 roku wydała Europejska Agencja Leków (*European Medicines Agency*)¹⁹⁷. Podobne wnioski dotyczące podwójnej blokady RAA, z użyciem IKA i ARA, przedstawiono wcześniej po publikacji wyników badania **ONTARGET**, były one też powodem szerokiej dyskusji na temat bezpieczeństwa tego typu terapii i znacząco zmieniły zalecane postępowanie u chorych z nadciśnieniem tętniczym i innymi chorobami układu sercowo-naczyniowego.

Wiele niekorzystnych czynników niewątpliwie wpłynęło na wyniki otrzymane w badaniu **ALTITUDE**, a były to mianowicie: znaczna część uczestników badania wykazywała zwiększoną podatność na powikłania związane ze spadkiem ciśnienia tętniczego, hipotonia

występowała częściej u pacjentów w wieku podeszłym oraz aż 69% chorych otrzymywało poza lekami badanymi diuretyki pętlowe. Zaznaczyć trzeba również, iż średnie wyjściowe ciśnienie tętnicze krwi wynosiło 137/74 mmHg, przy czym grupa aliskirenu miała niższe wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego w porównaniu z grupą kontrolną⁶⁵.

Mając zatem na uwadze zarówno wyniki badania *ALTITUDE*, jak również dotychczasowe doświadczenia wynikające z innych badań z użyciem aliskirenu, niniejsze badanie przeprowadzono z zastosowaniem jednego leku blokującego RAAs i włączano chorych z eGFR wyższym aniżeli 30 ml/min.

Bardzo ważne w aspekcie długoterminowego funkcjonowania nerki przeszczepionej jest zaawansowanie procesów śródmiąższowego włóknienia oraz zaniku cewek (*IF/TA; ang. interstitial fibrosis/tubular atrophy*). Problem ten nabiera szczególnego znaczenia podczas stosowania aliskirenu z uwagi na wysokie stężenia reniny i proreniny towarzyszące stosowaniu leku. Jak do tej pory zidentyfikowano dwa typy receptorów dla proreniny i reniny. Pierwszy z nich określony jako receptor mannozo-6-fosforanowy, tzw. receptor klirensujący, gdzie prorenina i renina po związaniu z nim ulegają następnie internalizacji oraz wewnątrzkomórkowej degradacji i nie aktywują za jego pośrednictwem szlaków profibrotyzujących^{71,73}. Drugi natomiast jest swoistym receptorem (pro)reninowym (PPR) wiążącym proreninę i reninę, zawierającym pojedynczą domeną transbłonową i dwa niezależne miejsca wiązania dla proreniny i reniny, które są niezbędne do wyzwolenia efektów wewnątrzkomórkowych. Jak zaznaczono we wstępie pracy, receptory te obecne są w wielu tkankach, również pozanerkowo^{7,56,73,160}. Pobudzenie PPR wiąże się z potencjalnym ryzykiem syntezy cytokin prozapalnych i wyzwalania procesów profibrotyzujących (m.in. za pośrednictwem TGF-β1, kolagenu typu I czy fibronektyny) niezależnie od „klasycznego” szlaku zależnego od Ang II. Do procesów tych może dochodzić w efekcie pobudzenia kinaz białkowych aktywowanych mitogenem p38 MAPK/Hsp-27 (*ang. mitogen - activated protein kinases*) i fosforylacji kinaz białkowych regulowanych przez sygnały pozakomórkowe (*ang. extracellular signal - regulated kinases 1/2*) ERK 1/2 (p44/p42), co zobrazowano także na rycinie 3^{9,75}. Innymi słowy aliskiren blokuje skutecznie angiotensynogenezę, nie blokując jednak wyzwalanych przez połączenie tego receptora z proreniną czy reniną wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych, niezależnych od Ang II^{198,199,200,201}. Inny pogląd przedstawia Simeoni M. i wsp., którzy uważają, że aliskiren oprócz osi

angiotensynozależnej, hamuje też aktywację receptora PRR poprzez konkurencyjne wiązanie się do tego receptora, blokując tym samym szlaki profibrotyczne¹⁶⁶. Verdecchia P. i wsp. podkreśla, że bardzo obiecującą cechą aliskirenu jest jego zdolność hamowania reniny oraz aktywowanej proreniny nawet wówczas, gdy są one przyłączone do receptorów PRR⁷³.

Warto podkreślić, że powyższy efekt aktywacji szlaków profibrotycznych niezależny od Ang II i aldosteronu, jeżeli byłby istotny podczas stosowania DRI, to także należy brać go po uwagę podczas terapii innymi inhibitorami układu RAA (IKA, ARA i MCRB)^{9,56,75,165}. Dodatkowo w przypadku wymienionych leków, dochodzi do zwiększenia aktywności reninowej osocza (ARO) oraz lokalnej produkcji Ang II, co może nasilać ekspresję profibrotycznych mediatorów^{91,161,177}. Pamiętać także należy, że przy wysokich PPC i PRC, poprzez aktywację szlaku PLZF (*promielocytarny czynnik transkrypcyjny o konfiguracji palca cynkowego; ang. transcription factor promyelocytic leukaemia zinc-finger;*) dochodzi do zmniejszenia ekspresji i liczby receptorów PPR, zwłaszcza zlokalizowanych w obrębie nerek. Być może zatem, pomimo wysokich PPC i PRC towarzyszących terapii aliskirenem, poprzez zahamowanie aktywacji profibrotycznych szlaków ERK 1/2 i MAPK p38 lek ten może hamować sygnały wewnątrzkomórkowe indukujące procesy zapalne i włóknienie w nerkach^{75,89,200}.

Zaznaczyć należy, że istnieją pewne teoretyczne podstawy do niepokoju związanego z pobudzeniem przez aliskiren procesu włóknienia, jednak dotychczas nie opublikowano prac, które wskazywałyby na ten niekorzystny efekt w trakcie stosowania aliskirenu¹⁶³. Wręcz przeciwnie, w mysim modelu progresywnego włóknienia nerek (COL4A3-/-) wykazano nefroprotekcyny efekt leczenia aliskirenem, przejawiający się poza zmniejszeniem białkomoczu, także obniżeniem syntezy cytokin profibrogennych, takich jak transformujący czynnik wzrostu β -1 (TGF- β 1) oraz czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF), a w rezultacie redukcję włóknienia i bliznowacenia w obrębie nerek względem grupy kontrolnej nieleczonej DRI²⁰². Badacze zaobserwowali jednocześnie dłuższe przeżycie zwierząt poddanych wspomnianej terapii. Wu W.P. i wsp. w eksperymentalnym modelu nefropatii zaporowej również wykazali, że terapia skojarzona aliskirenem z walsartanem zmniejszała włóknienie śródmiąższowe poprzez ograniczanie ekspresji mRNA dla TGF- β 1 oraz akumulacji kolagenu w śródmiąższu, a także nasilenie odczynu zapalnego m.in. w efekcie hamowania infiltracji makrofagów²⁰³. Powyższe leczenie wykazało również hamujące działanie na stopień uszkodzenia kanalików nerkowych. W innym badaniu przeprowadzonym u szczurów podwójnie transgenicznym w odniesieniu do angiotensynogenu i reniny (TG (m-Ren2)27)

oraz cukrzycą wywołaną streptozocyną, podanie aliskirenu doprowadziło do zahamowania włóknienia w obrębie kory nerek^{7,161}. Dla chorych po TN niezwykle ważne mogą być wyniki innego eksperymentu, w których stwierdzono, że stosowanie aliskirenu zmniejszało nacieki zapalne złożone z makrofagów, limfocytów CD4 i CD8 oraz komórek dendrytycznych w tkance nerkowej, co wskazuje także na działanie przeciwzapalne tego leku⁹.

W moim badaniu również analizowałam wpływ aliskirenu na pośrednie markery włóknienia nerek i wskaźniki uszkodzenia cewek nerkowych⁷. Już w 2011 roku wykazano w naszej Klinice, że zarówno terapia aliskirenem 300 mg/dobę, jak i perindoprilem 10 mg/dobę, obniżała stężenia markerów włóknienia nerek w moczu (transformujący czynnik wzrostu β -1; TGF- β 1) w porównaniu do placebo (w przypadku obu aktywnych terapii analiza *post-hoc*: $p < 0,05$), lecz bez istotnych statystycznie różnic pomiędzy DRI a IKA. W przypadku PIIINP (N-końcowy propeptyd prokolagenu typu III), który jest produktem degradacji kolagenu typu III i zatem pośrednim wskaźnikiem włóknienia nerek²⁰⁴, nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w jego wydalaniu pomiędzy dwiema aktywnymi terapiami a placebo. Przyczyną takich rozbieżności mógł być stosunkowo krótki czas prowadzonej obserwacji, który wynosił 8 tygodni dla każdej z nich. W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że pomimo wysokich PPC i PRC w trakcie terapii aliskirenem (odpowiednio wzrost o 100% i 1132% przy dawce 300 mg/dobę) także nie stwierdzono zwiększonego wydalania markerów włóknienia śródmiąższu nerek (TGF- β 1 i PIIINP). Co więcej, w efekcie terapii aliskirenem 300 mg/dobę doszło do znamiennej redukcji stężenia TGF- β 1 wydalanego z moczem względem placebo⁶⁴. Podobne wyniki uzyskano w innym badaniu, będącym podstawą mojej pracy magisterskiej, porównującym trzy typy terapii, w tym łączonej terapii telmisartanu z aliskirenem²⁰⁵. Wyniki tego badania pokazały, że najwyższe PRC występowały w efekcie podwójnej blokady układu RAA z zastosowaniem tego właśnie połączenia (aliskiren 300 mg/dobę oraz telmisartan 80 mg/dobę).

Oprócz oznaczania wskaźników włóknienia kolejnym drugorzędowym celem mojej pracy była ocena wpływu prowadzonej terapii na uszkodzenie cewek. Poza włóknieniem śródmiąższu jest to bardzo ważny element uszkodzenia nerki przeszczepionej (IF/TA)^{34,206}. Dotychczasowe badania przeprowadzone u chorych z PChN wykazały, że zmiany cewkowo-śródmiażdżowe są lepszym czynnikiem rokowniczym progresji w kierunku schyłkowej niewydolności nerek aniżeli zmiany w kłębuszkach nerkowych²⁰⁷.

W moim badaniu do oceny zmian w cewkach nerkowych użyłam wydalania z moczem N-acetylo- β -D-glukozaminidazy (NAG), która jest enzymem klasy hydrolaz obecnym w lizosomach proksymalnych cewek nerkowych, w warunkach fizjologicznych wydalany w małych ilościach do moczu, jako konsekwencja procesu egzocytozy. Zwiększone wydalanie tego enzymu stwierdzono w stanach uszkodzenia cewek nerkowych w przebiegu przewlekłych nefropatii. Wyróżnia się kilka izoenzymów NAG, wykazano jednak, że pomiar aktywności w moczu łącznie wszystkich frakcji enzymu jest wartościową i wystarczającą metodą oceny uszkodzenia cewek nerkowych^{7,151}. Podobnie jak w przypadku TGF- β 1, nie wykryto znaczących statystycznie różnic w odniesieniu do wydalania NAG z moczem w następstwie terapii aliskirenem oraz losartanem ($p=0,19$), obserwowano istotne statystycznie zmniejszenie aktywności tego enzymu w przypadku ARA względem placebo. Wyniki podobne do przedstawionych w niniejszej pracy uzyskano również w innych naszych badaniach z użyciem aliskirenu dotyczących populacji chorych z PChN^{115,208}.

Stres oksydacyjny jest związany z procesami proliferacji komórek, apoptozy oraz stanu zapalnego. W następstwie przesunięcia równowagi oksydacyjnej dochodzi do zwiększonej ekspresji genów dla wielu cytokin i chemokin prozapalnych oraz adhezyjnych molekuł. Jak wykazano w wielu badaniach, zaburzenie równowagi oksydacyjnej odgrywa istotną rolę w patogenezie PChN oraz powikłań sercowo-naczyniowych^{191,209}. Izoprostany oznaczane w moczu są uważane za dobre biomarkery stresu oksydacyjnego i peroksydacji lipidów *in vivo*²¹⁰. Peroksydacja lipidów jest dobrze poznanym procesem indukowanym przez wolne rodniki. Według aktualnej wiedzy stanowią one najlepszy wskaźnik peroksydacji lipidów w warunkach *in vivo* i pośrednio nasilenia stresu oksydacyjnego. Ocena stresu oksydacyjnego była kolejnym drugorzędnym celem mojej pracy. W moim badaniu użyłam komercyjnego zestawu do oznaczania 8-epi-prostaglandyny- $F_{2\alpha}$ (8-EPI-PGF $_{2\alpha}$) - należącej do izoprostanów. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wydalaniu 8-EPI-PGF $_{2\alpha}$, pomiędzy stosowanymi terapiami a placebo, jednak wartości te były wyraźnie niższe zwłaszcza po leczeniu aliskirenem ($5,06 \pm 0,49$ vs $5,58 \pm 0,59$ ng/mg kreatyniny po placebo).

Jak pokazały badania przeprowadzone na dużych populacjach pacjentów, bardzo istotnym elementem leczenia przy użyciu leków blokujących układ RAA jest bezpieczeństwo tego typu terapii^{93,196,211}. Z uwagi na poważne działania niepożądane wycofano się z popularnego wśród nefrologów, w pewnym okresie, leczenia podwójną blokadą

RAAs^{90,212,213}. Zawsze po wprowadzeniu do użycia nowego leku stawia się pytania dotyczące bezpieczeństwa jego użycia w szczególnych grupach chorych, a taką z pewnością są chorzy po przeszczepieniu nerki.

Bezpieczeństwo terapii aliskirenem było zatem jednym z drugorzędowych celów mojego badania. Realizację tego celu przeprowadzono na podstawie kilku elementów. Wobec tego, że w dużych badaniach klinicznych (*ONTARGET*, *ALTITUDE*) incydenty hiperkalemii oraz AKI były głównymi czynnikami decydującymi o ich zakończeniu, zdecydowano o ścisłej kontroli kaliemii i stężenia kreatyniny w surowicy w trakcie różnych etapów badania^{90,196,211}. Oznaczenia te przeprowadzano w krótkim czasie po zaleceniu „nowego” leczenia (7 dni), jak również w ostatnim dniu stosowania leku lub placebo. Innym elementem oceny tolerancji terapii były wypełniane ankiety, zawierające pytania dotyczące możliwych działań niepożądanych, oparte na charakterystyce produktu leczniczego (ChPL) aliskirenu i losartanu^{214,215}.

Dość specyficznym efektem leków blokujących układ RAA u chorych po TN jest obniżenie stężenia hemoglobiny. U chorych z tendencją do poliglobulii to działanie jest wykorzystywane w praktyce klinicznej (najczęściej w tej sytuacji stosuje się IKA). W badaniu poświęconym niniejszej rozprawie, podczas terapii aliskirenem, jak też losartanem obserwowano istotne statystycznie, ale nieistotne klinicznie obniżenie hemoglobiny (analiza *post-hoc* w obu przypadkach: $p < 0,05$). Warto jednak podkreślić, że u żadnego z pacjentów z tego powodu nie doszło do wystąpienia objawów klinicznych niedokrwistości, ani nie było konieczności jej leczenia. Nie zaobserwowano różnicy w tym względzie pomiędzy leczeniem aliskirenem a losartanem. Otrzymane wyniki są zbieżne z wcześniejszym badaniem u chorych po TN z zastosowaniem losartanu, gdzie stwierdzono obniżenie hemoglobiny względem karwedilolu i placebo^{125,156}.

Mając na uwadze to, że wzrost stężenia kreatyniny (w tym spełniający kryteria AKI) oraz hiperkalemia po zastosowaniu blokady RAAs są procesem dość dynamicznym, badania te wykonywano już po 7 dniach od rozpoczęcia leczenia. Nie zaobserwowano znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy wartościami kreatyniny/eGFR uzyskanymi na początku oraz po tygodniu od włączenia każdej aktywnej terapii, ani też nie rozpoznawano istotnej klinicznej hiperkalemii. Te ustalenia są zgodne z wcześniejszymi naszymi doświadczeniami, związanymi ze stosowaniem aliskirenu u chorych z PChN o podłożu nie-cukrzycowym²¹⁶. Także pomiędzy dwiema włączonymi terapiami nie wykazano istotności statystycznej zmiany

filtracji kłębuszkowej, analizując moment włączenia a tydzień upływający od ich zastosowania, stwierdzono nawet niewielki wzrost wyliczonego wskaźnika filtracji kłębuszkowej po leczeniu aliskirenem, ale bez znamienności statystycznej (średnia różnica 2,43 ml/min vs losartan 1,47 ml/min; $p=0,57$). Także po 8-tygodniowym okresie terapii nie było istotnych statystycznie zmian dotyczących stężenia kreatyniny, ani wyliczonej filtracji kłębuszkowej. Analizując przypadki poszczególnych chorych, u żadnego z nich nie stwierdzono wzrostu tych parametrów, który upoważniałby do rozpoznania AKI, wobec czego należy uznać zastosowaną terapię za bezpieczną w tym aspekcie w badanej grupie chorych.

Jak wcześniej wspomniano, ważnym czynnikiem decydującym o bezpieczeństwie terapii z użyciem leków blokujących RAAs jest także ocena stężenia potasu. W moim badaniu temu zagadnieniu poświęcono szczególną uwagę. Jak przypuszczano, w pierwszym tygodniu po włączeniu obu aktywnych terapii odnotowano znamienny statystycznie wzrost stężenia potasu, co jest też zgodne z danymi literaturowymi (w przypadku aliskirenu z $4,04 \pm 0,08$ mmol/L do $4,33 \pm 0,09$ mmol/L; $p < 0,01$, po losartanie z $3,98 \pm 0,07$ mmol/L do $4,35 \pm 0,10$ mmol/L; $p < 0,001$). Pomimo tego, że w przypadku obu typów terapii u większości chorych (11 po aliskirenem i 14 po losartanie) doszło do wzrostu stężenia potasu w surowicy, to zarówno w przypadku aliskirenu, jak również losartanu wzrost ten był nieistotny klinicznie. Nie odnotowano bowiem stężenia wyższego od 5,5 mmol/L oraz nie stwierdzono objawów klinicznych hiperkalemii w indywidualnych przypadkach. Warto również zauważyć, że nie wykazano, w tym względzie znamiennej różnicy pomiędzy lekami ($p=0,60$), co pozytywnie świadczy o bezpieczeństwie terapii DRI. W trakcie leczenia prowadzonego przez 8 tygodni stężenie potasu w surowicy krwi nie zmieniło się i było porównywalne pomiędzy dwoma okresami terapeutycznymi oraz placebo (odpowiednio, po terapii aliskirenem wynosiło: $4,25 \pm 0,49$ mmol/L vs losartanem $4,16 \pm 0,52$ mmol/L vs placebo $4,09 \pm 0,24$ mmol/L; $p=0,59$). Bezpieczeństwo związane z obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi i ewentualnymi incydentami hipotensji omówiono w dyskusji powyżej.

Według informacji producenta najczęściej obserwowanymi działaniami niepożądanymi aliskirenu mogą być bóle i zawroty głowy, biegunki, duszność, uczucie zmęczenia/znużenia, zapalenie nosogardzieli, rzadko kaszel, chociaż objawy te w większości nie występują częściej niż przy stosowaniu placebo²¹⁴. W przeprowadzonym badaniu zastosowałam kwestionariusz objawów ubocznych stosowanych terapii w oparciu o

subiektywne objawy kliniczne pacjentów. Na podstawie otrzymanych wyników, można stwierdzić, że badane leki były dobrze tolerowane przez pacjentów, a odnotowana ilość zgłaszanych działań niepożądanych stosowanych preparatów była porównywalna z placebo. Co istotne, żaden chory nie przerwał terapii z powodu objawów ubocznych stosowanego leczenia. Podczas terapii aliskirenem obserwowano najczęściej wysypkę; zaburzenia żołądkowo-jelitowe; dysfunkcje seksualne; koszmarne sny oraz zmęczenie. Biorąc pod uwagę, co dyskutowano wcześniej, że nie odnotowano incydentów hiperkaliemii, ani istotnego wzrostu stężenia kreatyniny w surowicy, uznać należy terapię aliskirenem w dawce 150 mg/dobę za bezpieczną u chorych po przeszczepieniu nerki z filtracją kłębuszkową powyżej 30 ml/min.

Krytyczna ocena zastosowanych metod i otrzymanych wyników badania

Pomimo doświadczeń ośrodka, w którym praca została wykonana w zakresie nefroprotekcji farmakologicznej i licznych publikacji dotyczących tego zagadnienia, na których wzorowałam się w trakcie planowania mojego badania, należy wziąć pod uwagę, że ma też ono kilka potencjalnych ograniczeń, o których dyskutuję w niniejszym rozdziale.

Bardzo ważnym badaniem mogącym połączyć wyniki badań laboratoryjnych ze zmianami morfologicznymi byłaby ocena bioptatu nerki przeszczepionej. Niestety w naszym ośrodku nie są wykonywane biopsje protokolarne, a poza tym ewentualne zmiany w obrazie histopatologicznym, wymagałyby z pewnością kilku lat obserwacji.

Blisko 30% pacjentów (5 chorych) stosowało w czasie badania diuretyk (furosemid), co dodatkowo może powodować zmiany w zakresie układu RAA. Dawka furosemidu nie ulegała jednak w trakcie badania zmianie, wobec czego element ten był stały w czasie wszystkich trzech faz leczenia.

Troje uczestników badania stosowało równocześnie atorwastatynę w czasie prowadzonego badania, która jak wykazano nawet 1,5-krotnie może zwiększać maksymalne stężenie aliskirenu^{164,217}, jednak podobnie jak w przypadku furosemidu, dawka leku pozostawała niezmienna w trakcie badania.

Bardzo ważnym ograniczeniem tego badania jest stosunkowo niewielka liczebność grupy badanej. Jednak jak wiadomo, w badaniach typu *cross-over* liczebność pozwalająca na udowodnienie postawionych hipotez może być znacząco mniejsza niż w innych typach badań. Badania takie mogą być traktowane tylko jako badania wstępne.

Relatywnie krótki czas trwania badania (*follow-up*) i okresów terapeutycznych, obejmujących 8 tygodni aktywnego leczenia może też być ograniczeniem efektywności stosowanych leków, ponieważ należy uwzględnić fakt, że dodatkowe korzystne nefroprotektoryjne efekty prowadzonych terapii, szczególnie efekty antyfibrotyczne czy hamujące uszkodzenie cewkowo-śródmiąższowe nerek, oceniane na podstawie wczesnych biomarkerów mogą nie być jeszcze w pełni mierzalne. Ujawnienie się tych efektów wymaga zwykle dłuższego czasu leczenia, o czym dyskutowano również powyżej w aspekcie biopsji nerki przeszczepionej.

W trakcie badania nie stosowano maksymalnych dawek leków (tj. aliskirenu w dawce 300 mg i losartanu w dawce 100 mg) z uwagi na specyficzną grupę chorych, jaką są chorzy po przeszczepieniu nerki i ich bezpieczeństwo. W bliźniaczo skonstruowanym badaniu w ramach badań Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych w Gdańsku przeprowadzonym u chorych z PChN wykazano, że odpowiedź na leczenie aliskirenem była wyraźnie zależna od stosowanej dawki i różniła się w przypadku stosowania 150 i 300 mg/dobę. Wysoka dawka leku znamienne obniżała wydalanie z moczem zarówno TGF- β 1, jak i 15-F $_{2\alpha}$ -izoprostanów, czego nie obserwowano po dawce 150 mg/dobę^{208,213}. Zatem wysoce prawdopodobne, iż dawki leków stosowanych w niniejszym badaniu, mimo, że z różnych powodów, omówionych wcześniej, wydawały się być optymalne dla pacjentów po TN, mogły być zbyt niskie, aby osiągnąć pożądane efekty nefroprotektoryjne.

Podsumowanie

Pomimo ustalonego postępowania nefroprotektoryjnego u chorych z PChN nerek własnych, nie ma do chwili obecnej zaleceń dotyczących optymalnej terapii nefroprotektoryjnej u chorych po przeszczepieniu nerki. Niezbite dowody na korzyści wynikające ze stosowania blokerów RAAs u chorych z PChN oraz jednoznacznie brzmiące zalecenia w tym zakresie wskazują na to, że zainteresowanie tym problemem transplantologów jest istotne. Niestety nie można bezpośrednio przenieść dotychczasowych ustaleń na populację chorych po przeszczepieniu nerki, ponieważ w tej grupie chorych współistnieje szereg dodatkowych czynników ryzyka progresji choroby. Dotychczasowe badania dotyczące farmakologicznej blokady RAAs w tej grupie chorych dały niejednoznaczne wyniki i nie został określony moment włączenia takiej terapii, ani optymalna dawka stosowanych leków.

Podkreślić należy, że unikalny mechanizm działania aliskirenu może czynić go potencjalnie lepszym i istotnym lekiem w aspekcie wielokierunkowej nefroprotekcji wśród chorych po przeszczepieniu nerki. Wyniki pochodzące z badań eksperymentalnych są bardzo obiecujące i prawdopodobne, iż znajdą one odzwierciedlenie także w dowodach płynących z badań klinicznych. Poparciem tej koncepcji są badania kliniczne wskazujące na korzystne działanie tego leku w zakresie redukcji albuminurii/białkomoczu, co potwierdzono także w niniejszym badaniu. Siła leku w obniżaniu albuminurii była podobna jak uznanego leku nefroprotekcyjnego, jakim jest losartan. Moje badanie wykazało również, że obawy związane z leczeniem aliskirenem, a wynikające z pojawiających się bardzo wysokich stężeń proreniny i reniny w trakcie terapii tym lekiem, są raczej nieuzasadnione, bowiem nie prowadzi ona do wzrostu wydalania z moczem markerów uszkodzenia cewek (NAG), włóknienia śródmięzcowego (TGF- β) oraz aktywacji stresu oksydacyjnego (8-EPI-PGF $_{2\alpha}$). Co bardzo istotne, terapia aliskirenem w grupie chorych po przeszczepieniu nerki jest bezpieczna i obarczona odsetkiem działań niepożądanych porównywalnym do placebo.

Wspomnieć należy, że moje badanie opierało się na pośrednich markerach nefroprotekcji, a dla udowodnienia korzystnego działania aliskirenu konieczne byłoby przeprowadzenie długoterminowych badań z udziałem większej populacji pacjentów po TN. Badania te powinny być oparte na powiązaniu diagnostyki laboratoryjnej z oceną histopatologiczną/immunohistochemiczną bioptatu nerki. Warto, aby przeprowadzone badania dały też odpowiedź na pytanie, czy redukcja albuminurii przekłada się na lepsze wyniki długoterminowe i bardziej pomyślne rokowanie chorych po przeszczepieniu nerki.

ROZDZIAŁ 6. WNIOSKI

- Aliskiren zastosowany w dawce dobowej 150 mg obniża albuminurię u chorych po przeszczepieniu nerki. Siła tego działania nie różni się od efektu uzyskanego podczas leczenia blokerem receptora AT₁ dla angiotensyny II (losartan) w dawce równoważnej hipotensyjnie.
- W badanej grupie chorych aliskiren był skutecznym lekiem hipotensyjnym i wykazywał porównywalne z losartanem działanie obniżające skurczowe (SBP), jak i rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi (DBP).
- Nie stwierdzono związku pomiędzy wartościami ciśnienia tętniczego a stopniem redukcji albuminurii w przypadku stosowania aliskirenu i losartanu. Wskazuje to, że na zmniejszenie albuminurii dodatkowo mają wpływ inne czynniki związane ze specyficznym mechanizmem działania tych grup leków.
- Leczenie aliskirenem nie zmniejszało aktywności N-acetylo-β-D-glukozaminidazy (pośredniego markera uszkodzenia cewek nerkowych) wydalanego z moczem. Działanie to nie różniło się od efektów uzyskiwanych podczas leczenia losartanem.
- W trakcie leczenia aliskirenem nie zmieniło się istotnie wydalanie z moczem transformującego czynnika wzrostu β-1 (cytokiny prozapalnej i profibrotycznej). Działanie to nie różniło się od efektów uzyskiwanych podczas leczenia losartanem.
- Terapia aliskirenem nie zmniejszyła wydalania z moczem wskaźnika stresu oksydacyjnego - izoprostanów (8-epi-prostaglandyny-F_{2α}; 8-EPI-PGF_{2α}). Działanie to nie różniło się od efektów uzyskiwanych podczas leczenia losartanem.
- Podczas terapii aliskirenem, podobnie jak i z udziałem losartanu obserwowano znamienny statystycznie, lecz nieistotny klinicznie spadek stężenia hemoglobiny w odniesieniu do placebo.

- Leczenie aliskirenem było dobrze tolerowane, a ilość działań niepożądanych nie różniła się od raportowych w trakcie przyjmowania losartanu oraz placebo. Dotyczy to również zmian stężenia potasu i funkcji nerki przeszczepionej.

ROZDZIAŁ 7. PIŚMIENICTWO

1. Król E, Rutkowski B, Czarniak P et al. Early detection of chronic kidney disease: Results of the PolNef study. *Am J Nephrol* 2009;29(3):264–73.
2. Trimarchi H. Role of aliskiren in blood pressure control and renoprotection. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2011;4:41–8.
3. Chamienia A. Nefroprotekcja w chorobach nerek własnych i w nerce przeszczepionej. *Forum Nefrol* 2012;5(3):218–31.
4. Lizakowski S, Tylicki L. Aliskiren—nowe możliwości nefroprotekcji? *Forum Nefrol* 2011;4(2):153–60.
5. Saran R, Robinson B, Abbott KC, et al. US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 2017;69(3):A7–8.
6. Renke M. Aktualne możliwości leczenia nefroprotekcijnego-blokada układu renina-angiotensyna-aldosteron i co dalej? *Rozpr habilitacyjna* 2010;1–29.
7. Sławińska-Morawska MM. Nefroprotekcyjne właściwości inhibitora reniny (aliskirenu) u chorych z przewlekłą chorobą nerek przebiegającą z białkomoczem. *Rozpr doktorska* 2013;1–108.
8. Tylicki L. Optymalizacja leczenia nefroprotekcijnego przy pomocy farmakologicznej blokady układu renina-angiotensyna-aldosteron. *Rozpr habilitacyjna* 2006;1–23.
9. Lizakowski S, Tylicki L. Aliskiren—nowe możliwości nefroprotekcji? *Forum Nefrol* 2011;4(2):153–60.
10. Chamienia A. Optymalizacja leczenia nerkozastępczego przy pomocy przeszczepiania nerek. *Rozpr habilitacyjna* 2013;1–32.
11. Fresenius Medical Care. *NephroCare Value Raport jakości – Polska 2016*. 2015;1–20.
12. Dębska-Ślizień A, Rutkowski B, Rutkowski P, Korejwo G, Gellert R. Stan terapii nerkozastępczej w Polsce – 2016. *Nefrol i Dializoterapia Pol* 2018;22(1):1–8.
13. Tylicki L, Rutkowski B. Adekwatna nefroprotekcja metodą skutecznej kardioprotekcji. *Forum Nefrol* 2011;4(2):144–52.
14. Dębska-Ślizień A, Bzoma B, Rutkowski B. Wyprzedzające przeszczepianie nerek. *Forum Nefrol* 2009;2(2):84–90.
15. Chamienia A, Dębska-Ślizień A, Rutkowski B. Optymalizacja leczenia nerkozastępczego

- przy pomocy przeszczepienia nerki. *Nefrol Dial Pol* 2012;16(4):164–71.
16. Stegall MD, Gaston RS, Cosio FG, Matas A. Through a Glass Darkly: Seeking Clarity in Preventing Late Kidney Transplant Failure. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(1):20–29.
 17. Toto DR. Transplantation: The role of RAAS blockade in kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol* 2016;12(3):129–31.
 18. Wieczorek-Godlewska R, Durlik M. Metody leczenia nerkozastępczego a wyniki przeszczepiania nerek. *Forum Nefrol* 2011;4(1):26–32.
 19. Centrum Organizacyjno-koordynacyjne. Biuletyn Informacyjny. *POLTRANSPLANT* 2018;26(1):1–144.
 20. KDIGO. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9 Suppl 3:S1-155.
 21. Commentary on Guidelines IV.2.3 Non-alloimmune factors:11–15.
 22. Bia M, Adey DB, Bloom RD, Chan L, Kulkarni S, Tomlanovich S. KDOQI US Commentary on the 2009 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Kidney Dis* 2010;56(2):189–218.
 23. Durlik M. Monitorowanie czynności przeszczepu nerki w przewlekłej opiece potransplantacyjnej:1–14.
 24. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O’Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349(24):2326–33.
 25. Perkowska-Ptasińska A. B. Diagnostyka zmian w nerce przeszczepionej. *Pol J Patol* 2011;1(Suplement 1):111–49.
 26. Tsampalieros A, Knoll GA. Evaluation and management of proteinuria after kidney transplantation. *Transplantation*. 2015;99(10):2049–60.
 27. Chrobak Ł, Dębska-Ślizień A, Rutkowski B. Epidemiologia przewlekłej choroby nerki przeszczepionej na podstawie różnych metod oznaczania wskaźnika filtracji kłębuszkowej. *Forum Nefrol* 2014;7(2):90–96.
 28. Małyszko J, Różański J w imieniu Grupy PChN. Nadciśnienie tętnicze nerkopochodne. *Forum Nefrol* 2009;2(2):120–29.
 29. Małyszko J, Bachórzewska-Gajewska H, Małyszko J. Choroby układu sercowo-naczyniowego u pacjentów po zabiegu transplantacji nerki. *Forum Nefrol* 2010;3(4):260–71.
 30. Ong SC, Gaston RS. Medical management of chronic kidney disease in the renal

- transplant recipient. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2015;24(6):587–93.
31. Durlik M. Patogeneza i klinika niedokrwistości u chorych po przeszczepie nerki. *Forum Nefrol* 2010;3(4):298–304.
 32. Małgorzewicz S, Czajka B, Kaczkan M, Dębska-Ślizień A, Rutkowski B. Niedożywienie białkowo-kaloryczne — rozpoznawanie i monitorowanie. *Forum Nefrol* 2013;6(2):77–83.
 33. Loupy A, Haas M, Solez K, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant* 2017;17(1):28–41.
 34. Amer H, Griffin MD. Modulating kidney transplant interstitial fibrosis and tubular atrophy: Is the RAAS an important target? *Kidney Int* 2014;85(2):240–43.
 35. Sawosz M, Bączkowska T. Biopsje protokolarne nerki przeszczepionej. *Forum Nefrol* 2012;5(2):105–9.
 36. Mannon RB, Matas AJ, Grande J, et al. Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: A potent predictor of allograft failure. *Am J Transplant* 2010;10(9):2066–73.
 37. Mazanowska O, Klinger M. Znaczenie układu enzymatycznego MMPs/TIMPs w upośledzonej degradacji macierzy pozakomórkowej w przewlekłym uszkodzeniu alop przeszczepu nerki. *Postępy Nauk Med* 2014;XXVII(2):110–3.
 38. Durlik M. Komentarz do prac. *Postępy Nauk Med* 2014;XXVII(2):123–4.
 39. Grenda R. Nawrót glomerulopatii po przeszczepieniu nerki. *Forum Nefrol* 2009;2(4):227–31.
 40. National Kidney Foundation. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* 2012;Supp:2(5):337–414.
 41. Seeman T. Management of proteinuria in the transplanted patient. *Pediatr Nephrol* 2015;30(6):889–903.
 42. Amer H, Cosio FG. Significance and Management of Proteinuria in Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(12):2490–2.
 43. Shamseddin MK, Knoll GA. Posttransplantation proteinuria: An approach to diagnosis and management. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6(7):1786–93.
 44. Pączek L, Mucha K, Foroniewicz B. *Transplantologia praktyczna. Odrzucanie przeszczepu*. Wyd.1. Lublin: Wydawnictwo CZELEJ; 2008.

45. Brouard S, Renaudin K, Souillou JP. Revisiting the natural history of IF/TA in renal transplantation. *Am J Transplant* 2011;11(4):647–9.
46. Nguyen G MD. The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:18–23.
47. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T SJ. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002;109:1417–27.
48. Oliver JA. Receptor-mediated actions of renin and prorenin. *Kidney Int* 2006;69:13–5.
49. Ferrario C.M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006;7:3–14.
50. Kokot F, Hyla-Klekot L. Układ reninowo-angiotensynowo-aldosteronowy (RAA) wczoraj i dziś. *Nefrol Dial Pol* 2008;12(3):181–5.
51. Tylicki L, Larczyński W, Rutkowski B. Leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron w leczeniu przewlekłych chorób nerek: podstawy patofizjologiczne. *Nefrol i Dializoterapia Pol* 2004;8(3):102–6.
52. Stompór T. Układ renina-angiotensyna-aldosteron w rozwoju i progresji przewlekłej choroby nerek. *Przew Lek* 2009;5:25–33.
53. Rutkowski B, Czekalski S, Myśliwiec M. Nefroprotekcja. Podstawy patofizjologiczne i standardy postępowania terapeutycznego. Wyd. 1. Lublin:Wydawnictwo CZELEJ; 2006.
54. Tylicki L, Rutkowski B. Wielopoziomowa blokada układu renina-angiotensyna-aldosteron w leczeniu schorzeń układu sercowo-naczyniowego. *Terapia nadciśnienia tętniczego* 2005;13(7–8 (168–169)):29–35.
55. Atlas SA. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *J Manag Care Pharm* 2007;13(8 (Supp S-b)):9–20.
56. Ritz E, Więcek A, Januszewicz A. Leki hamujące aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron w chorobach serca, naczyń i nerek. Kraków:Medycyna Praktyczna; 2010.
57. Cruzado JM, Rico J, Grinyó JM. The renin angiotensin system blockade in kidney transplantation: Pros and cons. *Transpl Int* 2008;21(4):304–13.
58. Geara AS, Azzi J, Jurewicz M, Abdi R. The renin-angiotensin system: an old, newly

- discovered player in immunoregulation. *Transplant Rev* 2009;23(3):151–8.
59. Tylicki L, Habicht A, Watschinger B, Horl WH. Treatment of hypertension in renal transplant recipients. *Curr Opin Urol* 2003;13(2):91–8.
 60. Holgado R, Anaya F, Castillo D Del. Angiotensin II type 1 (AT₁) receptor antagonists in the treatment of hypertension after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(Suppl 1):117–20.
 61. Iñigo P, Campistol JM, Lario S, et al. Effects of losartan and amlodipine on intrarenal hemodynamics and TGF-β₁ plasma levels in a crossover trial in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(4):822–7.
 62. Issa N, Ortiz F, Reule S, Kukla A, Kasiske B. The Renin-Aldosterone axis in kidney transplant recipients and its association with allograft function and structure. *Kidney Int* 2014;85(2):404–15.
 63. Renke M, Knap N, Tylicki L, Rutkowski P. Izoprostany-ważny wskaźnik stresu oksydacyjnego u chorych z objawami przewlekłej choroby nerek. *Pol Merkur Lek* 2013;14–7.
 64. Lizakowski S, Tylicki L, Renke M, et al. Aliskiren and perindopril reduce the levels of transforming growth factor-β in patients with non-diabetic kidney disease. *Am J Hypertens* 2012;25(6):636–9.
 65. Rutkowski B, Tylicki L. Nephroprotective action of Renin-Angiotensin-Aldosterone system blockade in chronic kidney disease patients: The landscape after ALTITUDE and VA NEPHRON-D trials. *J Ren Nutr* 2015;25(2):194–200.
 66. Tylicki L, Renke M, Rutkowski P, et al. Dual blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system with high-dose angiotensin-converting enzyme inhibitor for nephroprotection: An open, controlled, randomized study. *Scand J Urol Nephrol* 2008;42(4):381–8.
 67. Filipiak KJ. Leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron. 2006
 68. Tylicki L, Jakubowska A, Rutkowski B. Praktyczne aspekty zastosowania farmakologicznej blokady układu renina-angiotensyna-aldosteron w nefroprotekcji. *Forum Nefrol* 2009;2(1):1–9.
 69. Bolignano D, Palmer S, Navaneethan S, Strippoli G. Aldosterone antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4(4):542–51.

70. Gromotowicz A, Osmólska U, Mantur M, Szoka P. Prozakrzepowe działanie aldosteronu – nowe oblicze hormonu*. *Postępy Hig Med Dośw* 2010;64:471–81.
71. Hyla-Klekot L, Kokot F. (Pro)renina i konwertaza 2 angiotensyny – nowe aspekty patofizjologiczne i lecznicze układu reninowo-angiotensynowego (RAS). *Przegląd Kardiometaboliczny* 2008;3(3):209–12.
72. Trimarchi H, Orías M. Aliskiren and the Kidney: Beyond Hypertension. *Nephrol Res Rev* 2009;1(1):1–4.
73. Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease : role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(5):971–81.
74. Gradman AH, Kad R. Renin Inhibition in Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(5):519–28.
75. Lizakowski S, Tylicki L, Rutkowski B. Direct renin inhibition-a promising strategy for renal protection? *Med Sci Monit* 2013;19:451–7.
76. Roksnoer LCW, Verdonk K, Van Den Meiracker AH, Hoorn EJ, Zietse R, Danser AHJ. Urinary markers of intrarenal renin-angiotensin system activity in vivo. *Curr Hypertens Rep* 2013;15(2):81–8.
77. Tylicki L. Nefroprotekcja w przewlekłej chorobie nerek. Historia badań gdańskiego ośrodka nefrologicznego. *Nefrol Dial Pol* 2014;18(4):163–73.
78. Dębska-Ślizień A, Ślodziński Z, Rutkowski B. Jak żyć z przeszczepioną nerką. Poradnik dla pacjentów i ich bliskich. Wyd. 2. Lublin: Wydawnictwo CZELEJ; 2010.
79. Rutkowski P. Leczenie chorych na kn: dla kogo tylko nefroprotekcja? 2013.
80. Gaciong Z. Terapia - nadciśnienie tętnicze 2010.
81. Ślubowska K, Durlik M. Czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego u biorców przeszczepu nerki. *Forum Nefrol* 2014;7(4):241–8.
82. De Broe ME, Kajbaf F, Lalau J-D. Renoprotective Effects of Metformin. *Nephron Clin Pract* 2018;138:261–74.
83. Viazzi F, Leoncini G, Grassi G, Pontremoli R. Antihypertensive treatment and renal protection: Is there a J-curve relationship? *J Clin Hypertens* 2018:1–15.
84. Wheeler DC, Becker GJ. Summary of KDIGO guideline. What do we really know about management of blood pressure in patients with chronic kidney disease? *Kidney Int* 2013;83(3):377–83.

85. Ismail H, Mitchell R, McFarlane SI, Makaryus AN. Pleiotropic effects of inhibitors of the RAAS in the diabetic population: Above and beyond blood pressure lowering. *Curr Diab Rep* 2010;10(1):32–6.
86. Ponticelli C, Cucchiari D. Renin-angiotensin system inhibitors in kidney transplantation : a benefit-risk assessment. *J Nephrol* 2017;30(2):155–7.
87. Rutkowski B, Tylicki L. Podstawy leczenia nefroprotekcynowego. *Leki Współ Ter Pol* 2007;2:61–3.
88. Tylicki L, Lizakowski S, Rutkowski P, et al. The enhanced renin-angiotensin-aldosterone system pharmacological blockade-Which is the best? *Kidney Blood Press Res* 2012;36(1):335–43.
89. Lizakowski S, Tylicki L, Rutkowski P, Renke M. Safety of enhanced renin-angiotensin-aldosterone system inhibition with aliskiren in nondiabetic patients with chronic kidney disease. *Pol Arch Med Wewn* 2013;123(5):221-7.
90. Stompór T, Undas A. Dual blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in renal disease: what is the future? *Pol Arch Med Wewnętrznej* 2014;124(1–2):72–3.
91. Mende CW. Application of direct renin inhibition to chronic kidney disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010;24(2):139–49.
92. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJV, Zeeuw D. Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints (ALTITUDE): rationale and study design. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1663–71.
93. Tylicki L, Lizakowski S, Rutkowski B. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for nephroprotection: Current evidence and future directions. *J Nephrol* 2012;25(6):900–10.
94. Design Study. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345(12):861–9.
95. Viazzi F, Leoncini G, Grassi G, Pontremoli R. Antihypertensive treatment and renal protection: Is there a J-curve relationship? *J Clin Hypertens* 2018;1–15.
96. Carminatti M, Tedesco-Silva H, da Silva Fernandes NM, Sanders-Pinheiro H. Chronic kidney disease progression in kidney transplant recipients: A focus on traditional risk factors. *Nephrology* 2018.
97. Remuzzi G, Perna A RP. Retarding progression of chronic renal disease: The neglected issue of residual proteinuria. *Kidney Int* 2003;63(6):2254–61.

98. Carminatti M, Tedesco-Silva H, da Silva Fernandes NM, Sanders-Pinheiro H. Chronic kidney disease progression in kidney transplant recipients: A focus on traditional risk factors. *Nephrology* 2018.
99. Burton C, Harris K. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1996;27(6):765–75.
100. Fernández-Fresnedo G, Escallada R, Rodrigo E, et al. The risk of cardiovascular disease associated with proteinuria in renal transplant patients. *Transplantation* 2002;73(8):1345–8.
101. Roodnat JI, Mulder PGH, Rischen-Vos J, et al. Proteinuria after renal transplantation affects not only graft survival but also patient survival. *Transplantation* 2001;72(3):438–44.
102. Kang NR, Lee JE, Huh W, et al. Minimal proteinuria one year after transplant is a risk factor for graft survival in kidney transplantation. *J Korean Med Sci* 2009;24(SUPPL.1):129–34.
103. Fernández-Fresnedo G, Plaza JJ, Sánchez-Plumed J, Sanz-Guajardo A, Palomar-Fontanet R, Arias M. Proteinuria: A new marker of long-term graft and patient survival in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(SUPPL. 3):iii47–iii51.
104. Halimi JM, Buchler M, Al-Najjar A, et al. Urinary albumin excretion and the risk of graft loss and death in proteinuric and non-proteinuric renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007;7(3):618–25.
105. López V, Cabello M, Ruíz-Esteban P, et al. Impact of Early Low-Grade Proteinuria and Allograft Dysfunction on Survival in Expanded Criteria Donor Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc* 2015;47(9):2611–4.
106. Halimi JM, Laouad I, Buchler M, et al. Early low-grade proteinuria: Causes, short-term evolution and long-term consequences in renal transplantation. *Am J Transplant* 2005;5(9):2281–8.
107. Sancho A, Gavela E, Ávila A, et al. Risk Factors and Prognosis for Proteinuria in Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc* 2007;39(7):2145–7.
108. Lizakowski S. Autoreferat. *Rozpr habilitacyjna* 2014;1–25.
109. Rutkowski B. *Nefrologia i leczenie nerkozastępcze. Praktyczny przewodnik*. Via Medica. Gdańsk: 2013.
110. Solomon SD, Appelbaum E, Manning WJ, et al. Effect of the direct renin inhibitor

- aliskiren, the angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation* 2009;119(4):530–7.
111. Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, et al. New approaches to blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: characteristics and usefulness of the direct renin inhibitor aliskiren. *J Pharmacol Sci* 2010;113(4):296–300.
 112. Hiremath S, Fergusson DA, Fergusson N, Bennett A, Knoll GA. Renin-Angiotensin System Blockade and Long-term Clinical Outcomes in Kidney Transplant Recipients: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Kidney Dis* 2017;69(1):78–86.
 113. Ruilope LM. Angiotensin receptor blockers: RAAS blockade and renoprotection. *Curr Med Res Opin* 2008.
 114. Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ HN. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2008;358(23):2433–46.
 115. Lizakowski S, Tylicki L, Renke M, et al. Effect of aliskiren on proteinuria in non-diabetic chronic kidney disease: a double-blind, crossover, randomised, controlled trial. *Int Urol Nephrol* 2012;44(6):1763–70.
 116. Heinze G. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor or Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist Therapy Is Associated with Prolonged Patient and Graft Survival after Renal Transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(3):889–99.
 117. Schievink B, Kröpelin T, Mulder S, et al. Early renin-angiotensin system intervention is more beneficial than late intervention in delaying end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab* 2016;18(1):64–71.
 118. Morath C, Schmied B, Mehrabi A, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers after renal transplantation. *Clin Transplant* 2009;23(SUPPL.21):33–6.
 119. Segall L, Covic A, Goldsmith DJA. Direct renin inhibitors: The dawn of a new era, or just a variation on a theme? *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(9):2435–9.
 120. Schmidt M, Mansfield KE, Bhaskaran K, et al. Serum creatinine elevation after renin-angiotensin system blockade and long term cardiorenal risks : cohort study. *BMJ* 2017;1–9.
 121. Mikolasevic I, Zaputovic L, Zibar L, et al. Renin–angiotensin–aldosterone system inhibitors lower hemoglobin and hematocrit only in renal transplant recipients with

- initially higher levels. *Eur J Intern Med* 2016;29:98–103.
122. Karrie T, Menter A. Zastosowanie cyklosporyny w dermatologii. Część II. *Dermatologia po dyplomie* 2011;2(4):7–35.
 123. Halimi JM. Low-grade proteinuria and microalbuminuria in renal transplantation. *Transplantation* 2013;96(2):121–30.
 124. Kunz R, Friedrich C, Wolbers M, Mann J. Meta-analysis: effect of monotherapy and combination therapy with inhibitors of the renin angiotensin system on proteinuria in renal disease. *Ann Intern Med* 2008;148(3):30–48.
 125. Tylicki L, Biedunkiewicz B, Chamienia A, Wojnarowski K, Zdrojewski Z, Rutkowski B. Randomized placebo-controlled study on the effects of losartan and carvedilol on albuminuria in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006;81(1):52–6.
 126. Lutz J, Risch K, Liu S, et al. Angiotensin type 1 and type 2 receptor blockade in chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2006;70(6):1080–8.
 127. Rusai K, Schmaderer C, Hermans JJR, Lutz J, Heemann U, Baumann M. Direct Renin Inhibition in a Rat Model of Chronic Allograft Injury. *Transplantation* 2011;92(9):999–1004.
 128. Journal A. Special Issue: KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2009;9(Suppl 3):S1–155.
 129. Banasik M, Garcarek J, Kurcz J, Klinger M. Zwężenie tętnicy przeszczepionej nerki jako przyczyna nadciśnienia tętniczego. *Forum Nefrol* 2012;5(1):30–6.
 130. Domański L. Jak zmniejszyć ryzyko sercowo-naczyniowe u pacjentów po przeszczepieniu nerki. In: IX Gdańskie Repetytorium Nefrologiczne POST ASN MEETING. Gdańsk: Wykład 16; 2013. p. 1–14.
 131. Thomas B, Weir MR. The Evaluation and Therapeutic Management of Hypertension in the Transplant Patient. *Curr Cardiol Rep* 2015;17(11):19–21.
 132. Issa N, Ortiz F, Reule SA, et al. The renin-aldosterone axis in kidney transplant recipients and its association with allograft function and structure. *Kidney Int* 2014;85(2):404–15.
 133. Aftab W, Varadarajan P, Rasool S, Kore A, Pai RG. Beta and angiotensin blockades are associated with improved 10-year survival in renal transplant recipients. *J Am Heart Assoc* 2013;2(1):1–8.
 134. Suárez Fernández ML, G-Cosío F. Causes and consequences of proteinuria following

- kidney transplantation. *Nefrologia* 2011;31(4):404–14.
135. Guliyev O, Sayin B, Uyar ME, et al. High-grade proteinuria as a cardiovascular risk factor in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2015;47(4):1170–3.
 136. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *Blood Press* 2013;22:193–278.
 137. Heemann U, Abramowicz D, Spasovski G, Vanholder R. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on kidney transplantation: A European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(7):2099–106.
 138. Lin J, Valeri AM, Markowitz GS, D'Agati VD, Cohen DJ, Radhakrishnan J. Angiotensin converting enzyme inhibition in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2002;73(5):783–8.
 139. Chamienia A. 6. Indywidualizacja leczenia immunosupresyjnego a nefroprotekcja u pacjentów po przeszczepieniu nerki. In: Rutkowski B, Dębska-Ślizień A, editors. *Postępy w immunosupresji po przeszczepieniu nerki–2013*. Biblioteka pisma Forum Nefrol Gdańsk:Via Medica; 2013:56–75.
 140. Nouri-Majalan N, Ghafari A, Moghaddasi S. Effect of Angiotensin II Type-1 Receptor Blockers on Stable Allograft Kidneys: Prospective Randomized Study. *Transplant Proc* 2009;41(7):2832–4.
 141. Jennings DL, Taber DJ. Use of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors within the first eight to twelve weeks after renal transplantation. *Ann Pharmacother* 2008;42(1):116–20.
 142. Opelz G, Zeier M, Laux G, Morath C, Dohler B. No Improvement of Patient or Graft Survival in Transplant Recipients Treated with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers: A Collaborative Transplant Study Report. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(11):3257–62.
 143. Opinie i Standardy. Zasady leczenia niedokrwistości w przewlekłej chorobie nerek. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego. *Forum Nefrol* 2015;8(2):110–21.
 144. Persson F, Rossing P, Reinhard H, et al. Optimal antiproteinuric dose of aliskiren in type 2 diabetes mellitus: A randomised crossover trial. *Diabetologia* 2010;53(8):1576–80.
 145. Schmieder RE. Renin inhibitors: Optimal strategy for renal protection. *Curr Hypertens*

- Rep 2007;9(5):415–21.
146. Angeli F, Reboldi G, Clinica R, Preventiva C. Clinical Medicine: Therapeutics Good news from Aliskiren? Clin Med Ther 2009;1:999–1002.
 147. Persson F, Rossing P, Schjoedt KJ, et al. Time course of the antiproteinuric and antihypertensive effects of direct renin inhibition in type 2 diabetes. Kidney Int 2008;73(12):1419–25.
 148. Persson F, Rossing P, Reinhard H, et al. Renal effects of aliskiren compared with and in combination with irbesartan in patients with type 2 diabetes, hypertension, and albuminuria. Diabetes Care 2009;32(10):1873–9.
 149. Więcek A, Nieszporek T. Wartość diagnostyczna i lecznicza ciągłego ambulatoryjnego pomiaru ciśnienia tętniczego w przewlekłej chorobie nerek. In: Więcek A, Kokot F, editors. Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym. Kraków: Medycyna Praktyczna; Wyd. 1. 2014;13:35–8.
 150. Łysiak-Szydłowska W. Procedura badawcza oznaczania N-acetylo-glukozaminidazy (NAG) w moczu. 2005;1–3.
 151. Tylicki L, Renke M, Rutkowski P, Rutkowski B, Łysiak-Szydłowska W. Randomized, controlled study of the effects of losartan versus enalapril in small doses on proteinuria and tubular injury in primary glomerulonephritis. Med Sci Monit 2005;11(4):PI31-7.
 152. Quantikine E. Human TGF- β 1 Immunoassay:1–14.
 153. BIOXYTECH. Urinary 8-epi-Prostaglandin F2 α : Enzyme Immunoassay for Urinary Isoprostane:1–5.
 154. Hiremath S, Fergusson D, Doucette S, Mulay A V, Knoll GA. Renin angiotensin system blockade in kidney transplantation: A systematic review of the evidence. Am J Transplant 2007;7(10):2350–60.
 155. Czekański S. Sposoby hamowania progresji przewlekłej niewydolności nerek. In: Więcek A, Kokot F, editors. Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym. Kraków: Medycyna Praktyczna; Wyd. 1. 2005;4:71–6.
 156. Tylicki L, Biedunkiewicz B, Chamienia A, et al. Renal allograft protection with angiotensin II type 1 receptor antagonists. Am J Transplant 2007;7(1):243–8.
 157. Moniem A, Ahmed I. Can Direct Renin System Inhibitor (DRI) Offer More Protection to the CVS. 2008.

158. Tylicki L, Larczyński W, Rutkowski B. Leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron w leczeniu przewlekłych chorób nerek: aktualne zalecenia terapeutyczne. *Nefrol i Dializoterapia Pol* 2004;8(3):107–11.
159. Chaudhary K, Nistala R, Whaley-Connell A. Is there a future for direct renin inhibitors? *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19(5):653–61.
160. Rywik T, Leszek P. Inhibitory reniny – nowe możliwości blokowania układu renina-angiotensyna-aldosteron. 2008.
161. Wiggins KJ, Kelly DJ. Aliskiren: A novel renoprotective agent or simply an alternative to ACE inhibitors? *Kidney Int* 2009;76(1):23–31.
162. Hermanowicz JM, Buczek W. Aliskiren-doustny inhibitor reniny. *Kardiologia Pol* 2008;66(9 (supl. 3)):358–61.
163. Kokot F, Hyla-Klekt L. Aliskiren-czy tylko alternatywny bloker układu reninowo-angiotensynowo-aldosteronowego (RAA)? *Nefrol Dial Pol* 2009;13:189–91.
164. Angeli F, Reboldi G, Poltronieri C, et al. Efficacy and safety profile of aliskiren: practical implications for clinicians. *Curr Drug Saf* 2014;9(2):106–17.
165. Sureshkumar KK, Vasudevan S, Marcus RJ, Hussain SM, McGill RL. Aliskiren: clinical experience and future perspectives of renin inhibition. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9(5):825–37.
166. Simeoni M, Nicotera R, Colao M, et al. Direct inhibition of plasmatic renin activity with aliskiren: a promising but under-investigated therapeutic option for non-diabetic glomerulonephritis. *Int Urol Nephrol* 2016;48(2):229–37.
167. Riccioni G. Aliskiren in the Treatment of Hypertension and Organ Damage. *Cardiovasc. Ther.* 2011;29(1):77–87.
168. Chaudhary K, Nistala R, Whaley-Connell A. Is there a future for direct renin inhibitors? *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19(5):653–61.
169. Campbell DJ. Interpretation of plasma renin concentration in patients receiving aliskiren therapy. *Hypertension* 2008;51(1):15–8.
170. Januszewicz W, Januszewicz A, Prejbisz A. Inhibitory reniny. *Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym*. In: *Nefrologia i Nadciśnienie Tętnicze*. 2006;6(27):9–14.
171. Hiremath S, Fergusson D, Doucette S, Mulay A V, Knoll GA. Renin angiotensin system blockade in kidney transplantation: a systematic review of the evidence. *Am J Transplant.* 2007; 7(10):2350–60.

172. Jiang Y, Song T, Qiu Y, et al. Effect of renin-angiotensin system inhibitors on survival in kidney transplant recipients : A systematic review and meta-analysis. *Kaohsiung J Med Sci* 2018;34(1):1–13.
173. Satoh S, Horikawa Y, Kakinuma H. Clinical characteristics of normotensive renal transplant recipients with microalbuminuria and effects of angiotensin II type I receptor antagonist on urinary albumin excretion. *Int J Urol* 2004;11:585–91.
174. Tylicki L, Rutkowski P, Renke M, Rutkowski B. Renoprotective effect of small doses of losartan and enalapril in patients with primary glomerulonephritis: Short-term observation. *Am J Nephrol* 2002;22(4):356–62.
175. Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE J, S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F I, H, Kristiansson K L-PO, Lindholm LH, Nieminen MS OP, Oparil S WHLSG. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): A randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002;359:995–1003.
176. Weir MR, Burgess ED, Cooper JE, et al. Assessment and Management of Hypertension in Transplant Patients. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(6):1248–60.
177. Pinto R., Gradman AH. Direct renin inhibition: An update. *Curr Hypertens Rep* 2009;11(6):456–62.
178. Şen S, Sabırlı S, Özyiğit T, Üresin Y. Aliskiren: Review of efficacy and safety data with focus on past and recent clinical trials. *Ther Adv Chronic Dis* 2013;4(5):232–41.
179. Boschmann M, Nussberger J, Engeli S, et al. Aliskiren penetrates adipose and skeletal muscle tissue and reduces renin-angiotensin system activity in obese hypertensive patients. *J Hypertens* 2012;30(3):561–6.
180. Shin JI, Palta M, Djamali A, Kaufman DB, Astor BC. The association between renin-angiotensin system blockade and long-term outcomes in renal transplant recipients: The Wisconsin allograft recipient database (WisARD). *Transplantation* 2016;100(7):1541–9.
181. Chronic kidney disease in adults: assessment and management. NICE Guideline 2014;1–60.
182. Brenner B., Cooper M., Zeeuw D., Al. E. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy *N Engl J Med* 2001;345(12):861–9.

183. Renke M, Tylicki L, Rutkowski P, Wojnarowski K, Lysiak-Szydlowska W, Rutkowski B. Low-dose dual blockade of the renin-angiotensin system improves tubular status in non-diabetic proteinuric patients. *Scand J Urol Nephrol* 2005;39(6):511–7.
184. Tylicki L, Rutkowski P, Renke M, et al. Triple Pharmacological Blockade of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Nondiabetic CKD: An Open-Label Crossover Randomized Controlled Trial. *Am J Kidney Dis* 2008;52(3):486–93.
185. Renke M, Rutkowski P, Tylicki L, Rutkowski B. Combination treatment and renal function in patients with chronic kidney disease. *JRAAS* 2010;11(2):146–7.
186. (KDIGO); Kidney Disease: Improving Global Outcomes. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013;Suppl.(3):1–150.
187. Litwin M, Grenda R. Zasady leczenia hipotensyjnego i renoprotekcyjnego u dzieci i młodzieży z przewlekłą, przeddializacyjną niewydolnością nerek.
188. Kriz W. IMephrology Dialysis Transplantation Progressive renal failure — inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. 1996:1738–42.
189. Brenner BM, Lawler E V., Mackenzie HS. The hyperfiltration theory: A paradigm shift in nephrology. *Kidney Int* 1996;49(6):1774–7.
190. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of Progressive Nephropathies. *N Engl J Med* 1998;339:1448–56.
191. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Jhangri GS CGB. Biomarkers of inflammation and progression of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:237–45.
192. Pączek L., Niewczas T. Białkomocz: wybrane aspekty patogenetyczne i lecznicze. In: Więcek A, Kokot F, editors. *Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym*. Kraków: Medycyna Praktyczna; Wyd. 1. 2002;2:117–24.
193. Tylicki L, Dębska-Ślizień A, Lizakowski S, et al. Aliskiren reduces albuminuria after kidney transplantation. *Acta Biochim Pol* 2017;64(2):221–6.
194. Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, et al. Treatment with aliskiren ameliorates tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats. *JRAAS* 2015;16(4):1329–36.
195. López V, Martin M, Cobelo C, et al. Renin-angiotensin system dual blockade using angiotensin receptor plus aliskiren decreases severe proteinuria in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2010;42(8):2883–5.

196. Parving H-H, Brenner BM, McMurray JJV, et al. Cardiorenal End Points in a Trial of Aliskiren for Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2012;367(23):2204–13.
197. European Medicines Agency. PRAC recommends against combined use of medicines affecting the renin-angiotensin (RAS) system Recommendation will now be considered by CHMP for final opinion. 2014;44.
198. Danser AHJ. The increase in renin during renin inhibition: Does it result in harmful effects by the (pro)renin receptor. *Hypertens Res* 2010;33(1):4–10.
199. Scheffe JH, Unger T, Funke-Kaiser H. PLZF and the (pro)renin receptor. *J Mol Med* 2008;86(6):623–7.
200. Scheffe JH, Neumann C, Goebel M, et al. Prorenin engages the (pro)renin receptor like renin and both ligand activities are unopposed by aliskiren. *J Hypertens* 2008;26(9):1787–95.
201. Feldt S, Maschke U, Dechend R, Luft FC, Muller DN. The putative (pro)renin receptor blocker HRP fails to prevent (pro)renin signaling. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(4):743–8.
202. Gross O, Girgert R, Rubel D, Temme J, Theissen S, Müller GA. Renal protective effects of aliskiren beyond its antihypertensive property in a mouse model of progressive fibrosis. *Am J Hypertens* 2011;24(3):355–61.
203. Wu W-P, Chang C, Chiu Y, et al. A reduction of unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by a therapy combining valsartan with aliskiren. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299(5):F929-41.
204. El Ghouli B, Squalli T, Servais A, et al. Urinary procollagen III aminoterminal propeptide (PIIINP): A fibrotest for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5(2):205–10.
205. Imko-Walczuk B, Piesiaków ML, Okuniewska A, et al. Risk factors for skin cancer development in patients after organ transplantation. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2012;66.
206. Teppo AM, Törnroth T, Honkanen E, Grönhagen-Riska C. Urinary amino-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) as a marker of interstitial fibrosis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003;75(12):2113–9.
207. Gavin J. Becker; Tim D. Hewitson. The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9(2):133–8.
208. Renke M, Lizakowski S, Tylicki L, et al. Aliskiren attenuates oxidative stress and improves tubular status in non-diabetic patients with chronic kidney disease-placebo

- controlled, randomized, cross-over study. *Adv Med Sci* 2014;59(2):256–60.
209. Zoja C, Abbate M RG. Progression of chronic kidney disease: insights from animal models. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15(3):250–7.
210. Milne GL, Musiek ES MJ. F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers* 2005;10(Suppl. 1):10–23.
211. Verdecchia P, Sleight P, Mancina G, et al. Effects of telmisartan, ramipril, and their combination on left ventricular hypertrophy in individuals at high vascular risk in the Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global End Point Trial and the Telmisartan Randomized Assessment. *Circulation* 2009;120(14):1380–9.
212. Tylicki L, Jakubowska A, Lizakowski S, Świątlik D, Rutkowski B. Management of renin-angiotensin system blockade in patients with chronic kidney disease under specialist care. Retrospective cross-sectional study. *JRAAS* 2015;16(1):145–52.
213. Lizakowski S, Tylicki L, Renke M, et al. Aliskiren and perindopril reduce the levels of transforming growth factor- β in patients with non-diabetic kidney disease. *Am J Hypertens* 2012;25(6):636–9.
214. Charakterystyka Produktu Leczniczego Aliskiren. 2007;1–62.
215. Charakterystyka Produktu Leczniczego Losartanum kalicum:1–18.
216. Lizakowski S, Tylicki L, Rutkowski P, et al. Safety of enhanced renin-angiotensin-aldosterone system inhibition with aliskiren in nondiabetic patients with chronic kidney disease. *Pol Arch Med Wewn* 2013;123(5):221–7.
217. Vaidyanathan S, Camenisch G, Schuetz H, et al. Pharmacokinetics of the oral direct renin inhibitor aliskiren in combination with digoxin, atorvastatin, and ketoconazole in healthy subjects: The role of P-glycoprotein in the disposition of aliskiren. *J Clin Pharmacol* 2008;48(11):1323–38.

ROZDZIAŁ 8. ANEKS

Wykaz Tabel i Rycin

Spis Tabel:

Tabela 1.	Immunologiczne i nieimmunologiczne czynniki ryzyka rozwoju i progresji śródmiąższowego włóknienia/zaniku cewek (IF/TA).....s. 10
Tabela 2.	Inne, poza hamowaniem układu RAA, możliwości postępowania nefroprotektoryjnego u pacjentów z przewlekłą dysfunkcją nerki przeszczepionej ^{6, 7, 26,82}s. 24
Tabela 3.	Badania kliniczne potwierdzające nefroprotektoryjne właściwości farmakologicznej blokady RAA [na podstawie ^{7,52,65,68,87,92,93,94}].....s. 26
Tabela 4.	Najczęstsze przyczyny nadciśnienia tętniczego u chorych po KTx.....s. 34
Tabela 5.	Charakterystyka pacjentów uczestniczących w badaniu.....s. 44
Tabela 6.	Podstawowa choroba nerek będąca przyczyną PChN w stadium 5.....s. 46
Tabela 7.	Parametry kliniczne i biochemiczne podczas poszczególnych faz badania..s. 59
Tabela 8.	Zależność pomiędzy UACR a SBP i DBP krwi po 8-tygodniowej terapii aliskirenem i losartanem.....s. 60
Tabela 9.	Regresja wieloraka dla zmiennej zależnej UACR w przypadku terapii aliskirenem.....s. 61
Tabela 10.	Regresja wieloraka dla zmiennej zależnej UACR w przypadku terapii losartanem.....s. 61
Tabela 11.	Wpływ aliskirenu i losartanu na drugorzędowe punkty końcowe badania.s. 64
Tabela 12.	Podsumowanie zmian głównych parametrów laboratoryjnych w czasie trwania badania.....s. 67
Tabela 13.	Zmiana stężenia kreatyniny i potasu w surowicy oraz wskaźnika filtracji

	kłębuszkowej po 7 dniach od włączenia leczenia.....s. 68
Tabela 14.	Działania niepożądane występujące <i>de novo</i> zgłaszane przez pacjentów w trakcie przyjmowania badanych leków.....s. 74
Tabela 15.	Wpływ leków blokujących układ RAA na stężenie proreniny/reniny, aktywność reninową osocza (PRA) oraz stężenie angiotensyny I i II (Ang I i II).....s. 77
Tabela 16.	Analityka pozostałych parametrów oznaczonych w Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku (UCK GUMed) podczas każdej wizyty kontrolnej i/lub wizyt „bezpieczeństwa”s. 124

Spis Rycin:

Rycina 1.	Patomechanizm IF/TA.....s. 15
Rycina 2.	Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) po zastosowaniu: A) Bezpośredniego inhibitora reniny B) Blokera receptorów AT ₁ dla angiotensyny II.....s. 17
Rycina 3.	Wpływ angiotensyny II, aldosteronu, proreniny i reniny na uszkodzenie nerek oraz punkty uchwytu leków blokujących układ RAA.....s. 31
Rycina 4.	Protokół badania.....s. 50
Rycina 5.	Leki zastosowane w badaniu klinicznym – forma zaślepienia leków i placebo.....s. 52
Rycina 6.	Wskaźnik stężenia albumina/kreatynina (UACR) w poszczególnych fazach badania.....s. 57
Rycina 7.	SBP i DBP uzyskane na podstawie ABPM podczas poszczególnych faz badania.....s. 58
Rycina 8.	Porównanie zmian aktywności N-acetylo-β-D-glukozaminidazy (NAG) w moczu podczas terapii aliskirenem i losartanem oraz

	placebo.....	s. 65
Rycina 9.	Wpływ zastosowanych terapii na wydalanie z moczem izoprostanów (8-EPI-PGF _{2α}).....	s. 66
Rycina 10.	Wpływ aliskirenu i losartanu na wydalanie z moczem TGF-β1.....	s. 67
Rycina 11.	Zmiany stężenia potasu w surowicy krwi podczas aktywnych terapii aliskirenem i losartanem.....	s. 69
	Rycina 11A. Stężenie potasu w surowicy przed włączeniem i po tygodniu terapii.....	s. 69
	Rycina 11B. Zmiana stężenia potasu w surowicy przed włączeniem i po tygodniu terapii.....	s. 70
Rycina 12.	Zmiany Scr podczas terapii aliskirenem i losartanem.....	s. 70
	Rycina 12A. Scr przed włączeniem i po tygodniu terapii.....	s. 70
	Rycina 12B. Zmiana Scr przed włączeniem i po tygodniu terapii.....	s. 71
Rycina 13.	Wskaźnik filtracji kłębuszkowej (eGFR wg CKD-EPI) po tygodniu od rozpoczęcia leczenia aliskirenem i losartanem.....	s. 72
	Rycina 13A. Wartości eGFR wg CKD-EPI po tygodniu od rozpoczęcia terapii aliskirenem i losartanem.....	s. 72
	Rycina 13B. Różnice wartości eGFR wg CKD-EPI po tygodniu od rozpoczęcia terapii aliskirenem i losartanem.....	s. 73
Rycina 14.	Indywidualny profil UACR po terapii aliskirenem.....	s. 82
Rycina 15.	Indywidualny profil UACR po terapii losartanem.....	s. 83

Zgoda Komisji Bioetycznej

NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
PRZY GDAŃSKIM UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a
telefax 58/349-10-11 - sekretariat, tel. 58/349-12-60 - przewodniczący

NKEBN/163/2011

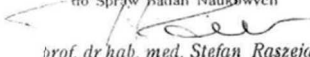
Gdańsk, 2011-05-09

Pan
Prof. dr hab. med. Bolesław Rutkowski
Kierownik Katedry i Kliniki Nefrologii,
Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Gdański Uniwersytet Medyczny

W odpowiedzi na zgłoszenie badań z dnia 14.04.2011 r. na temat:
„Ocena wpływu bezpośredniego inhibitora reniny (aliskiren) na markery uszkodzenia nerki przeszczepionej” (praca, statutowa ST-4 planowana do przeprowadzenia pod kierunkiem dr hab. Leszka Tylickiego) - Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym na posiedzeniu w dniu 28 kwietnia 2011 roku zapoznała się z wyżej wymienionym projektem pracy i wyraża zgodę na jej prowadzenie w zakresie przedstawionym we wniosku; gdyż są to badania poznawcze, dokonywane w interesie badanych pacjentów, nie stanowiące istotnego zagrożenia dla ich zdrowia.

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA
DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3A
telefax 058 349 10 11

PRZEWODNICZĄCY
Niezależnej Komisji Bioetycznej
do Spraw Badań Naukowych


prof. dr hab. med. Stefan Raszeja

Szczegółowa metodologia analiz przeprowadzonych w Laboratorium Zakładu Żywienia Klinicznego i Diagnostyki Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed)

Aktywność N - acetylo - β - D - glukozaminidazy (NAG)

Zasada metody: W związku z tym, że NAG jest enzymem lizosomalnym, katalizującym hydrolizę wiązań β -glikozydowych w gangliozydach, w badaniu tym substratem z wyboru do oznaczania aktywności NAG, był p-nitrofenylo-2-deoksy-2-N-acetylo-amino- β -D-glukopiranozyd (p-NO₂-Glc-NAC), z którego, pod wpływem działania NAG uwolniony został p-nitrofenol (produkt), wykazujący maksimum absorpcji przy $\lambda=405$ nm w środowisku alkalicznym. Obliczenie wartości NAG oparto na podstawie współczynnika absorpcji molowej produktu reakcji - p-nitrofenolu, który wynosi 18,5 cm²/μmol przy w/w długości fali^{150,208}.

Jednostka aktywności 1 IU/l NAG odpowiada przyrostowi absorpcji o 0,037 (czułość badania) i jest ona równa uwolnieniu 1 μmola p-nitrofenolu w ciągu 1 minuty, czemu odpowiada w warunkach oznaczania uwolnienie 3 nmol p-nitrofenolu w ciągu 30 minut przez enzym zawarty w 100 μl moczu.

Wymienione odczynniki przygotowano zgodnie z procedurą badawczą:¹⁵⁰

- 1) 0,1 mol/l bufor cytrynianowy o pH = 4,15
- 2) 6,3 mmol/l substrat p-NO₂-Glc-NAC (substrat w buforze cytrynianowym; roztwór przechowywano w stanie zamrożonym, trwały do 6 miesięcy)
- 3) 0,4 mol/l bufor glicynowy o pH = 10,5 (przechowywany w lodówce; trwały do miesiąca).

Przeprowadzenie badania: 0,4 ml 6,3 mmol/l roztworu substratu w buforze cytrynianowym w probówkach typu eppendorf preinkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C. Do próby odczynnikowej (zerowej) przed preinkubacją dodano 100 μl wody destylowanej. Następnie dodano 1 ml 0,4 mol/l buforu glicynowego o pH 10,5 do próby odczynnikowej oraz prób kontrolnych (ślepych). Dla każdej próbki moczu (próby badanej) przygotowano próbę ślepą. Reakcję rozpoczęto dodaniem po 100 μl moczu zarówno do próby badanej, jak i kontrolnej (ślepej). Inkubację prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C, a następnie po tym czasie dodano 1 ml 0,4 mol/l buforu glicynowego o pH 10,5 do prób badanych, celem zakończenia reakcji oraz alkalizacji środowiska. Próbki kolorymetrowano przy $\lambda=405$ nm w stosunku do próby odczynnikowej. Następnie obliczono różnicę między absorpcją próby

badanej, a próby kontrolnej i uzyskaną wartość podstawiono do odpowiedniego wzoru zgodnie z instrukcją badania ¹⁵⁰.

Stężenie transformującego czynnika wzrostu β - 1 (TGF - β 1)

Zasada metody: Nieznakowane przeciwciała monoklonalne, specyficzne wobec TGF- β 1 opłaszczają uprzednio 96-studzienkową płytkę polistyrenową (fazę stałą) dołączoną do zestawu i były to tzw. przeciwciała wykrywające (pierwszorzędowe). Kolejnym etapem było nałożenie na płytkę roztworu białka celem zablokowania możliwości niespecyficznego wiązania innych białek do opłaszczających fazę stałą przeciwciał, podczas kolejnych etapów testu. Naniesienie na płytkę prób badanych i serii standardów, a następnie inkubacja, prowadziła do związania zawartego w nich antygeny (TGF- β 1) ze swoistym przeciwciałem obecnym na płytce, tworząc kompleks immunologiczny. Następnie po etapie odpłukania niezwiązanych z przeciwciałem antygenów, dodano znakowane (sprężone z enzymem - peroksydazą chrzanową; HRP) przeciwciała poliklonalne anty-TGF- β 1, tzw. skoniugowane z enzymem przeciwciała drugorzędowe, które wiążą przeciwciała wykrywające. Również po etapie inkubacji, odpłukano znakowane enzymem, niezwiązane przeciwciała. Końcowy etap stanowiło dodanie chromogennego dla enzymu substratu, który poprzez enzym (związany do przeciwciał drugorzędowych) konwertowany był do wykrywalnej, barwnej formy produktu. Reakcję zakończono dodaniem roztworu *Stop Solution* i odczytaniem absorbancji przez czytnik spektrofotometryczny przy $\lambda=450$ nm w stosunku do próby odczynnikowej (zerowej). Intensywność (natężenie) barwy powstałego produktu było wprost proporcjonalne do stężenia TGF- β 1 zawartego w moczu badanym i serii standardów.

Wymienione poniżej odczynniki oraz serię standardów do krzywej kalibracyjnej (wzorcowej) przygotowano zgodnie z procedurą badawczą:¹⁵²

- 1) 1 N roztwór kwasu chlorowodorowego (HCl) przeznaczony do aktywacji prób badanych
- 2) Odczynnik: 1,2 N NaOH z 0,5 M HEPES
- 3) Roztwór buforu płuczącego, zawierający buforowany surfaktant ze środkiem konserwującym
- 4) Roztwór do rozcieńczania serii standardów, zawierający buforowane białko ze środkiem konserwującym

5) Roztwór substratu (odczynnik zawierający stabilizowany nadtlenek wodoru i chromogen – 3,3',5,5' - tetrametylobenzydynę)

6) Seria standardów (odczynników kalibracyjnych) zawierająca aktywowane, rekombinowane ludzkie TGF- β 1 o znanych stężeniach: 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml oraz 0 pg/ml (sam roztwór do rozcieńczania standardów).

Przeprowadzenie badania: Bezpośrednio przed przystąpieniem do właściwej analizy, w pierwszym etapie dokonano aktywacji TGF- β 1 zawartego w badanych próbkach moczu do immunoreaktywnej formy poprzez dodanie 20 μ l 1N HCl (roztworu kwasu chlorowodorowego) do 100 μ l moczu, następnie 10-minutowej preinkubacji w temperaturze 22°C, a później neutralizacji zakwaszonej próbki moczu 20 μ l uprzednio przygotowanym odczynnikiem 1,2 N NaOH z 0,5 M HEPES, doprowadzając próbki do pH między 7,2-7,6. W drugim etapie natomiast, do każdej studzienki płytki nałożono 50 μ l dołączonego do zestawu analitycznego roztworu buforowanego białka ze środkiem konserwującym.

Następnie na tak przygotowaną płytkę naniesiono po 50 μ l standardów oraz aktywowanych wcześniej, prób badanych celem 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 22°C na wytrząsarce. Po upływie tego czasu energicznym ruchem całkowicie usunięto zawartość wszystkich wypełnionych studzienek, odwracając płytkę. Kolejnym krokiem był cykl 4-krotnego płukania niezwiązanych z przeciwciałem antygenów, każdorazowo 400 μ l przygotowanym uprzednio roztworem buforu płuczącego do wszystkich studzienek. Po każdym etapie płukania, całkowicie opróżniono studzienki, po czym dodano do wszystkich 100 μ l dołączonego do zestawu roztworu koniugatu (roztworu znakowanych enzymem przeciwciał poliklonalnych anti-TGF- β 1). Całość inkubowano kolejne 2 godziny w temperaturze 22°C na wytrząsarce. Następnie powtórzono jak wyżej usunięcie zawartości całej płytki poprzez jej energiczne odwrócenie, a później etap 4-krotnego płukania, jak powyżej, podczas którego usunięto przy pomocy roztworu buforu płuczącego, niezwiązane przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z enzymem. Do każdej studzienki dodano 100 μ l roztworu substratu - *Substrate Solution* (3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę; TMB) i przeprowadzono 30-minutową inkubację w temperaturze 22°C na wytrząsarce, chroniąc płytkę przed dostępem światła, celem konwersji przez enzym substratu do wykrywalnej, barwnej formy produktu. Reakcję zakończono przy pomocy 100 μ l dołączonego do zestawu roztworu zatrzymującego reakcję enzymatyczną - *Stop Solution*, powodującego zmianę barwy z niebieskiej na żółtą.

Odczytu absorbancji dokonano przy $\lambda=450$ nm, nie później niż 30 minut od dodania *Stop Solution*, przy użyciu spektrofotometru DRG E-LIZA MAT-3000 z automatycznym czytnikiem.

Wykonano duplikaty wszystkich stężeń standardów, gdzie wartość absorbancji wyrażono jako średnią z dwóch pomiarów każdego standardu o odpowiednim stężeniu TGF- β 1 względem absorbancji próby zerowej (standardu o stężeniu 0 pg/ml). Stężenie prób badanych zostało odczytane w oparciu o wykreśloną krzywą kalibracyjną, sporządzoną dla w/w znanych stężeń TGF- β 1 - odpowiednio po uwzględnieniu absorbancji względem próby zerowej. Uzyskane wyniki pomnożono przez wartość 1,4 (biorąc pod uwagę rozcieńczenie próbek badanych na etapie aktywacji).

Stężenie izoprostanów (8-*epi*-prostaglandyny- $F_{2\alpha}$; 8-EPI-PGF $_{2\alpha}$)

Zasada metody: Faza stała (płytką) dołączona do zestawu, opłaszczona została uprzednio przeciwciałami poliklonalnymi anty-8-EPI-PGF $_{2\alpha}$, wiążącymi specyficznie izoprostany. Metoda ta polegała na tym, że następowało współzawodnictwo o wiązanie do przeciwciał opłaszczających fazę stałą, pomiędzy izoprostanami (antygenem pochodzącym z materiału), zawartymi w moczu badanym (lub w serii standardów), a standaryzowanymi, skoniugowanymi izoprostanami, czyli antygenem wyznakowanym enzymem (peroksydazą chrzanową; HRP). Końcowym etapem było dodanie roztworu 3,3',5,5' - tetrametylobenzydyny (TMB), będącego substratem dla zastosowanego w badaniu enzymu i krótka inkubacja mająca na celu konwersję substratu do barwnej formy produktu, a następnie zatrzymanie reakcji przy użyciu roztworu *Stop Reagent*. Odczytu absorbancji prób badanych oraz serii standardów dokonano przy pomocy czytnika spektrofotometrycznego przy $\lambda=450$ nm w stosunku do próby odczynnikowej (zerowej).

Intensywność zabarwienia powstałego produktu była odwrotnie proporcjonalna do stężenia izoprostanów zawartych w próbce moczu pacjenta (lub w serii standardów).

Wymienione poniżej odczynniki oraz serię standardów do krzywej kalibracyjnej (wzorcowej) przygotowano zgodnie z procedurą badawczą:¹⁵³

- 1) Roztwór buforu płuczącego (przemywającego)
- 2) Roztwór koniugatu - enzymu (peroksydazy chrzanowej; HRP) ze standaryzowanymi izoprostanami i buforem wzmacniającym barwę produktu

3) Seria standardów (odczynniki kalibracyjne), zawierająca izoprostany (8-EPI- $\text{PGF}_{2\alpha}$) o znanych stężeniach: 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,05 ng/ml oraz 0 ng/ml (próbka zawierająca jedynie dołączony do zestawu analitycznego roztwór buforu do rozcieńczania).

Przeprowadzenie badania: Badanie rozpoczęto od nałożenia 100 μl próbek moczu (rozcieńczonych uprzednio w stosunku 1:4 buforem do rozcieńczania, zgodnie z zaleceniami producenta) oraz po 100 μl przygotowanych standardów do poszczególnych studzienek 96-dołkowej płytki. Następnie do każdej studzienki dodano 100 μl przygotowanego wcześniej koniugatu (roztworu znakowanych enzymem izoprostanów wraz z buforem wzmacniającym barwę powstałego kompleksu reakcyjnego). Płytkę inkubowano w wilgotnej komorze w temperaturze 22°C przez 2 godziny na wytrząsarce. Po upływie tego czasu energicznym ruchem całkowicie usunięto zawartość wszystkich wypełnionych studzienek, odwracając płytkę. Następnie trzykrotnie do każdej studzienki na około 2-3 minuty dodano 300 μl roztworu buforu płuczącego (przemywającego) celem wypłukania niezwiązanych z przeciwciałem izoprostanów. Po każdym etapie płukania całkowicie opróżniono wszystkie studzienki, po czym następnie do każdej z nich dodano 200 μl dołączonego do zestawu roztworu substratu dla zastosowanego w badaniu enzymu – *TMB Substrate*. Kolejnym krokiem była 30-minutowa inkubacja w temperaturze 22°C na wytrząsarce, podczas której dodany substrat konwertowany był przez enzym zawarty w koniugacie do barwnego produktu - do uzyskania niebieskiego odcienia badanych próbek oraz serii standardów (przy czym standard o stężeniu 0 ng/ml wykazywał najbardziej intensywną barwę). Ostatnim etapem było dodanie 50 μl roztworu *Stop Reagent* zatrzymującego reakcję katalizowaną przez enzym i zmiana barwy z niebieskiej na żółtą.

Tabela 16.

Analityka pozostałych parametrów oznaczonych w Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku (UCK GUMed) podczas każdej wizyty kontrolnej i/lub wizyt „bezpieczeństwa”

BADANY PARAMETR	MATERIAŁ BIOLOGICZNY	METODA BADAWCZA	APARATURA POMIAROWA
Elektrolity: Sód	Dobowa zbiórka moczu (DZM)	Pośrednia metoda potencjometryczna z zastosowaniem elektrod jonoselektywnych (ISE)	Aparat Architect c8000 - moduł biochemiczny; aparat i odczynniki firmy Abbott
Potas	Surowica 3,5 ml		
Kreatynina	Surowica 3,5 ml	Enzymatyczna metoda Jaffe'go wykluczająca interferencje ze strony substancji Jaffe dodatnich	
Inhibitor kalcyneuryny (cyklosporyna A i takrolimus)	Obwodowa krew pełna żylna 2,0 ml pobrana na 3,6 mg K ₂ EDTA (etylenodiamino-tetraoctan tripotasowy)	Kompetycyjna, heterogenna metoda immunochemiluminescencji z zastosowaniem paramagnetycznych mikrocząsteczek opłaszczonych przeciwciałami (CMIA)	Aparat Abbott i2000SR - moduł immunochemiczny
Morfologia krwi obwodowej (hemoglobina)	Krew pełna żylna 2,0 ml pobrana na 3,6 mg K ₂ EDTA (antykoagulant)	Metoda fotometryczna przy użyciu laurylosiarczanu sodu (SLS)	Autoanalizator SYSMEX XE2100

Akronimy oraz pełne nazwy badań klinicznych, cytowanych w rozprawie:

AIPRI – Angiotensin - Converting Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study

REIN – Ramipril Efficacy in Nephropathy

RENAAL – Reduction of Endpoints in Non – Insulin Dependent Diabetes Mellitus with the Angiotensin II Antagonist Losartan

IDNT – Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial

DETAIL – Diabetics Exposed to Telmisartan and Enalapril

ONTARGET – Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial

ALTITUDE - Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardiovascular and Renal Disease Endpoints Trial