

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Ernesta Mačionienė

# Chemokinių koncentracijos šlapime ir išvestinių bendro kraujo tyrimo rodiklių reikšmė inksto transplantato atmetimo diagnostikai ir prognozei

**DAKTARO DISERTACIJA**

Medicinos ir sveikatos mokslai,  
Medicina (M 001)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2015–2024 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Gastroenterologijos, nefrourologijos ir chirurgijos klinikoje.

**Mokslinis vadovas – prof. dr. Marius Miglinas** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

**Pirmininkas:**

doc. dr. Albertas Čekauskas (Vilniaus universitetas, Medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

**Nariai:**

doc. dr. Ilkka Helanterä (Helsinkio universitetas, Suomija, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

dr. Rokas Račkauskas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

doc. dr. Ieva Stundienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Edita Žiginskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. balandžio 2 d. 12 val. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Raudonojoje auditorijoje. Adresas: Santariškių g. 2, Vilnius, Lietuva.

Tel. +37067338637; el. paštas: [ernesta.macioniene@mf.vu.lt](mailto:ernesta.macioniene@mf.vu.lt)

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.742>

<https://orcid.org/0000-0001-6554-5552>

VILNIUS UNIVERSITY

Ernesta Mačionienė

# The Significance of Urinary Chemokines and Complete Blood Count Indicators for the Diagnosis of Kidney Transplant Rejection and Prognosis

**DOCTORAL DISSERTATION**

Medical and Health Sciences,  
Medicine (M 001)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2015 and 2024 at the Clinic of Gastroenterology, Nephro-Urology and Surgery, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Vilnius University.

**Academic supervisor Prof. Dr. Marius Miglinas** (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman:**

Assoc. Prof. Dr. Albertas Čekauskas (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

**Members:**

Adjunct Prof. Dr. Ilkka Helanterä (Helsinki University, Finland, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Dr. Rokas Račkauskas (Vilnius University Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Assoc. Prof. Dr. Ieva Stundienė (Vilnius University Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Edita Žiginskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine– M 001)

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 12:00 p.m. on the 2nd of April 2025 in the Red Auditorium of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos.

Address: Santariškių str. 2, Vilnius, Lithuania.

Tel. +37067338637; email: [ernesta.macioniene@mf.vu.lt](mailto:ernesta.macioniene@mf.vu.lt)

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University as well as on the website of Vilnius University:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## SANTRUMPOS

|              |                                                    |
|--------------|----------------------------------------------------|
| AKTH         | adrenokortikotropinis hormonas                     |
| APL          | antigeną pateikianti ląstelė                       |
| AUC          | plotas po kreive                                   |
| BoF indeksai | funkcijų biologijos indeksai                       |
| CRB          | C reaktyvusis baltymas                             |
| CXCL         | chemokinas                                         |
| DNR          | deoksiribonukleorūgštis                            |
| dd-cfDNR     | donoro kilmės neląstelinė DNR                      |
| DSA          | donorui specifiniai antikūnai                      |
| aGFG         | apskaičiuotas glomerulų filtracijos greitis        |
| GSIL         | galutinės stadijos inkstų liga                     |
| GS           | genitalinis santykis                               |
| GTS          | genitotiroidinis santykis                          |
| HD           | hemodializė                                        |
| iBKTi        | išvestiniai bendro kraujo tyrimo rodiklių indeksai |
| IKP          | interkvartilinis periodas                          |
| IL           | interleukinas                                      |
| KMI          | kūno masės indeksas                                |
| KNI          | kalcineurino inhibitoriai                          |
| LIL          | lėtinė inkstų liga                                 |
| LMI          | leukocitų mobilizacijos indeksas                   |
| MFI          | vidutinis fluorescencinis intensyvumas             |
| mRNR         | matricinė (informacinė) ribonukleorūgštis          |
| miRNR        | mikroribonukleorūgštis                             |
| p            | statistinio reikšmingumo lygmuo                    |
| PI           | pasikliautinis intervalas                          |
| TMI          | trombocitų mobilizacijos indeksas                  |
| SN           | standartinis nuokrypis                             |
| SP           | standartinė paklaida                               |
| ŠS           | šansų santykis                                     |
| TRH          | tireotropiną atpalaiduojantis hormonas             |
| TNF $\alpha$ | tumoro nekrozės faktorius alfa                     |
| VULSK        | Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos   |
| ŽLA          | žmogaus leukocitų antigenai                        |

## TURINYS

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. ĮVADAS .....                                                                                                                                      | 8  |
| 1.1. Mokslinio darbo aktualumas .....                                                                                                                | 8  |
| 1.2. Mokslinio darbo tikslas .....                                                                                                                   | 9  |
| 1.3. Literatūros apžvalga .....                                                                                                                      | 9  |
| 1.3.1. Inkstų transplantacijos istorija .....                                                                                                        | 9  |
| 1.3.2. Transplantato atmetimo patogenezė .....                                                                                                       | 10 |
| 1.3.2.1. Antigeno atpažinimas ir pateikimas .....                                                                                                    | 10 |
| 1.3.2.2. Hiperūminė, ūminė ir lėtinė atmetimo reakcija .....                                                                                         | 11 |
| 1.3.2.3. Ląstelinė ir antikūnų sukelta atmetimo reakcija ....                                                                                        | 12 |
| 1.3.3. Transplantato atmetimo diagnostika .....                                                                                                      | 14 |
| 1.3.3.1. Transplantato atmetimo klinikinė išraiška .....                                                                                             | 14 |
| 1.3.3.2. Histologinė atmetimo diagnostika .....                                                                                                      | 14 |
| 1.3.3.3. Donorui specifiniai antikūnai .....                                                                                                         | 18 |
| 1.3.3.4. Nauji transplantato atmetimo biožymenys .....                                                                                               | 19 |
| 1.3.4. Chemokinių apžvalga .....                                                                                                                     | 20 |
| 1.3.4.1. Chemokinių klasifikacija ir struktūra .....                                                                                                 | 20 |
| 1.3.4.2. Chemokinių biologinė reikšmė .....                                                                                                          | 22 |
| 1.3.4.3. CXCL9 ir CXCL10 klinikinė reikšmė .....                                                                                                     | 24 |
| 1.3.5. Poliomos BK viruso nefropatija .....                                                                                                          | 27 |
| 1.3.6. Išvestiniai bendro kraujo tyrimo rodiklių indeksai .....                                                                                      | 27 |
| 2. MOKSLINIO DARBO NAUJUMAS .....                                                                                                                    | 29 |
| 3. MOKSLINIO DARBO UŽDAVINIAI .....                                                                                                                  | 30 |
| 4. METODIKA .....                                                                                                                                    | 31 |
| 5. REZULTATAI .....                                                                                                                                  | 36 |
| 5.1. Tiriamųjų charakteristika .....                                                                                                                 | 36 |
| 5.2. Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 ryšys su klinikiniais duomenimis .....                                                                               | 37 |
| 5.1.1. I uždavinys: Šlapimo biožymenų CXCL9 ir CXCL10 savybių vertinimas diagnozuojant histologiškai patvirtintą inksto transplantato atmetimą ..... | 38 |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.2. II uždavinys: CXCL9 ir CXCL10 ryšio su atskirais histologiniais pakitimais pagal Banfo klasifikacinę sistemą analizė .....             | 46  |
| 5.1.3. III uždavinys: Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 ryšio su kitomis inksto transplantato patologijomis vertinimas .....                         | 51  |
| 5.1.4. IV uždavinys: Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 ryšys su inksto transplantato prognoze.....                                                   | 53  |
| 5.1.5. V uždavinys. Išvestinių bendro kraujo tyrimo indeksų ryšys su chemokinais CXCL9 bei CXCL10 ir transplantato atmetimu bei prognoze..... | 56  |
| 6. REZULTATŲ APTARIMAS.....                                                                                                                   | 67  |
| 7. KLINIKINIS TAIKYMAS.....                                                                                                                   | 75  |
| 8. IŠVADOS.....                                                                                                                               | 77  |
| 9. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....                                                                                                                   | 78  |
| 10. SUMMARY .....                                                                                                                             | 96  |
| 11. MOKSLINIAI STRAIPSNIAI ir PRANEŠIMAI DISERTACIJOS<br>TEMA.....                                                                            | 133 |
| 12. GYVENIMO APRAŠYMAS.....                                                                                                                   | 134 |
| 13. CURRICULUM VITAE.....                                                                                                                     | 138 |
| 14. PRIEDAI .....                                                                                                                             | 142 |
| 15. PADĖKA.....                                                                                                                               | 143 |
| 16. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .....                                                                                                                 | 144 |

# 1. ĮVADAS

## 1.1. Mokslinio darbo aktualumas

Epidemiologinės studijos rodo, kad lėtine inkstų liga (LIL) pasaulyje serga vienas iš dešimties suaugusių asmenų, 2019 m. duomenimis, absoliučiais skaičiais tai sudarė daugiau nei 850 milijonų žmonių [1, 2]. Kai LIL pasiekia galutinę stadiją, paciento gyvybei palaikyti reikalinga pakaitinė inkstų terapija: dializė arba inksto transplantacija. Naujų hemodializuoti per metus pradėtų asmenų skaičius įvairiose šalyse svyruoja nuo mažiau nei 72,5 asmens/1 mln. populiacijos iki daugiau nei 161,4 asmens/1 mln. populiacijos [3]. Pasaulyje atliekama nuo 3,0 iki daugiau nei 27,8 inksto transplantacijų/1 mln. gyventojų per metus [3]. Inksto transplantacija – tai ne tik paciento gyvenimo kokybę pagerinantis gydymo būdas: tyrimų duomenys rodo, kad transplantacija ilgina recipientų išgyvenamumą, sumažina kardiovaskulinių ligų riziką, didina pacientų darbingumą, palyginti su gydymu dializėmis [4]. Kad inksto transplantatas nebūtų atmetas recipiento imuninės sistemos, pacientams reikia nuolat vartoti imuninę sistemą slopinančius vaistus. Vis dėlto vidutinis inksto transplantato išgyvenamumas įvairiose šalyse svyruoja nuo 8 iki 12 metų, kai inkstas persodinamas iš mirusio donoro, ir nuo 12 iki 20 metų, kai transplantuojamas gyvo donoro inkstas [5]. Dažniausia priežastis, dėl kurios išsivysto transplantato galutinės stadijos inkstų liga (GSIL) ir transplantatas prarandamas – tai transplantato atmetimas [6]. Praradus transplantatą, galima atlikti pakartotinę inksto transplantaciją, tačiau sulig kiekviena nauja transplantacija didėja recipiento imuninis įsijautrinimas, darosi vis sunkiau parinkti tinkamą donorą, padidėja naujo transplantato atmetimo rizika [7]. Taigi nepaprastai svarbu anksti įtarti ir diagnozuoti transplantato atmetimą, laiku pradėti gydyti ir taip kiek įmanoma pailginti inksto transplantato, o kartu ir recipiento, išgyvenamumą.

Šiuo metu inksto transplantato atmetimas diagnozuojamas atliekant transplantato biopsiją ir vertinant atitinkamus histologinius kriterijus, taip pat matuojami donorui specifinių antikūnų titrai ir vertinami kiti, mažiau specifiniai rodikliai, tokie kaip kreatinino koncentracija kraujo serume, proteinurija [8]. Nors šie diagnostikos metodai plačiai taikomi klinikinėje praktikoje, tačiau vis dar trūksta neinvazinių, ankstyvų ir lengvai atliekamų biožymenų transplantato atmetimui diagnozuoti.

## 1.2. Mokslinio darbo tikslas

Šio darbo tikslas yra įvertinti šlapimo žymenis (chemokiną 9 (CXCL9) ir chemokiną 10 (CXCL10)) bei išvestinius bendro kraujo tyrimo indeksus kaip potencialius inksto transplantato atmetimo biožymenis ir ištirti jų ryšį su inksto transplantato prognoze.

## 1.3. Literatūros apžvalga

### 1.3.1. Inkstų transplantacijos istorija

Pirmoji sėkminga inksto transplantacija buvo atlikta 1954 m. amerikiečių chirurgo Josepho Murray vadovaujamos grupės Bostone. Inkstas persodintas iš gyvo donoro, identiško dvynio, recipientas po operacijos išgyveno 8 metus [9]. Vis dėlto tolesni bandymai persodinti organus iš neidentiškų donorų patyrė daug nesėkmių dėl transplantato atmetimo [10]. 1964 m. Starzlis aprašė hiperūminę atmetimo reakciją dėl ABO kraujo grupių nesuderinamumo ir apibrėžė jų derinimo taisykles. Terasaki 1964 m. aprašė mikrocitotoksiškumo tyrimą, kuris buvo kritiškai svarbus tolesnei transplantacinės imunologijos raidai ir praktiniam žmogaus leukocitų antigenų (ŽLA) sistemos derinimui [11]. Iki 1974 m. inkstų transplantacija išgyveno keturias eras: jokios imunosupresijos, imunosupresija apšvitinant visą kūną, medikamentinė imunosupresija azatioprinu ar prednizolonu ir gydymas antilimfocitiniais antikūnais [12]. Transplantatų išgyvenamumas kardinaliai pagerėjo po 1974 m., kai į klinikinę praktiką atėjo naujesni imunosupresantai: ciklosporinas, vėliau – takrolimas ir kiti [13]. Lietuvoje pirmoji inksto transplantacija atlikta 1970 m. iš kadaverinio donoro, o 1974 m. iš gyvo donoro [14, 15].

Atsivėrus naujoms imunosupresijos galimybėms, pagerėjus transplantatų išgyvenamumui, pastebėta ir neigiamų imunosupresijos padarinių – padidėjusi onkologinių ligų, infekcijų rizika [16, 17]. Taigi toliau ieškota būdų, kaip užtikrinti optimalią imunosupresiją, tobulinti transplantato atmetimo diagnostikos būdai. Į klinikinę praktiką įdiegta histologinė transplantato atmetimo diagnostika, paremta Banfo (Banff) klasifikaciniais kriterijais [18]. Taip pat į antikūnų sukkelto atmetimo diagnostinius kriterijus įtrauktas donorui specifinių antikūnų nustatymas [19]. Identifikuoti ir potencialūs serologiniai arba šlapimo biožymenys (donoro kilmės neląstelinė DNR, chemokinai), farmakodinamiai biožymenys (Torque teno virusas), prognostiniai biožymenys (iBox balai), tiriami būdai sukelti organizmo toleranciją transplantatui (reguliacinių T limfocitų infuzijos), tobulinama ksenotransplantacija ir organų inžinerija [20–25]. Taigi šiuolaikinė transplantologija vystosi keliomis kryptimis: recipiento ir transplantato

suderinamumo ir parinkimo tobulinimas, transplantato ir recipiento išgyvenamumo gerinimas užtikrinant optimalią imunosupresiją (biožymenimis grįstas vaistų dozavimas, transplantato monitoravimas dėl galimo atmetimo), imuninės tolerancijos tyrimai ir alternatyvių alotransplantacijai organų šaltinių paieška. Šio tiriamojo darbo niša ir yra tyrimas biožymenų, skirtų transplantato išgyvenamumui gerinti neinvaziniu būdu monitoruojant transplantato veiklą dėl galimo atmetimo, kai ankstyva atmetimo diagnostika padeda laiku užkirsti kelią transplantato praradimui.

### 1.3.2. Transplantato atmetimo patogenezė

#### 1.3.2.1. Antigeno atpažinimas ir pateikimas

Inksto transplantato atmetimo patogenezėje labai svarbus vaidmuo tenka T limfocitų aktyvinimui, tai atliekama trimis signalais.

Pirmasis signalas gaunamas, kai T limfocitas atpažįsta svetimą antigeną. Tai gali nutikti šiais būdais: tiesioginiu, pusiau tiesioginiu ir netiesioginiu [26, 27]. Tiesioginiu būdu antigenas atpažįstamas, kai neapdorotus donoro ŽLA T limfocitui savo paviršiuje pateikia donoro antigeną pateikianti ląstelė (APL), o netiesioginiu – kai apdorotus donoro ŽLA fragmentus T limfocitui pateikia recipiento APL. Pusiau tiesioginio pateikimo metu recipiento APL gauna ir pateikia neapdorotus donoro kilmės ŽLA.

Antrasis signalas T limfocitui aktyvinti – tai kostimuliacija. Kai antigenas pateikiamas ir atpažįstamas T limfocito receptorių, prasideda sąveika tarp APL kostimuliacinių molekulių ir jų ligandų T limfocitų paviršiuje: CD40 molekulė ant APL paviršiaus jungiasi su savo ligandu CD40L, esančiu ant T limfocito, o tai paskatina B7 (CD80/CD86) ir kitų kostimuliacinių molekulių ekspresiją ant APL [28]. T limfocito molekulė CD28 tada jungiasi su savo ligandais CD80 ir CD86 ant APL. Šios sąveikos skatina tolesnę T limfocito aktyvaciją. Vis dėlto kostimuliacinis būdas paskatina ir aktyvaciją slopinančių receptorių gamybą, apsaugodamas nuo nekontroliuojamo T limfocitų aktyvinimo. Jei naivus T limfocitas nėra stimuliuojamas, jis žūva apoptozės būdu.

Trečiąjį signalą lemia prouždegiminiai citokinai, kuriems veikiant, T limfocitai proliferuoja ir diferencijuojasi į efektorinius T limfocitus. Signalą formuoja sąveika tarp citokinų ir padidėjusios citokinų receptorių ekspresijos T limfocito paviršiuje [29]. Vienas iš tokių receptorių – tai IL-2 receptoriaus alfa grandis (CD25). Ją suaktyvinus, toliau aktyvinamas intraląstelių T limfocito signalų kelias, į kurį įeina mitogeno aktyvinama proteinkinazė, kalcineurinas ir PI3 K molekulė. Skatinami transkripcijos veiksniai, kurie

reguliuoja IL-2, interferono ir kitų citokinų gamybą. Šie ir kiti citokinai skatina T limfocitų proliferaciją ir diferenciaciją į efektorinius CD4<sup>+</sup> bei citotoksinius CD8<sup>+</sup> T limfocitus.

B limfocitai taip pat svarbūs šiame procese, nes gali moduluoti T limfocitų aktyvinimą dalyvaudami antigeno pateikime, kostimuliacijoje ir gamindami prouždegiminius citokinus [30, 31].

#### 1.3.2.2. Hiperūminė, ūminė ir lėtinė atmetimo reakcija

Pagal pažeidimo pobūdį transplantato atmetimo reakcija gali būti skirstoma į hiperūminę, ūminę ir lėtinę [32].

Hiperūminė atmetimo reakcija dažniausiai įvyksta per kelias minutes ar valandas po transplantacijos, kai jau esantys antikūnai prieš transplantato antigenus aktyvina komplemento sistemą, vyksta neutrofilų mobilizacija, endotelinės ląstelės bei trombocitai sekretuoja lipidus, kurie sukelia koaguliaciją bei išemiją. Pažeidus transplantato kraujagyslių endotelį, formuojasi mikrotrombai, galiausiai įvyksta persodinto organo trombozė ir žūtis [33].

Ūminė transplantato atmetimo reakcija paprastai įvyksta, kai svetimą antigeną atpažinusios antigeną pateikiančios ląstelės sąveikauja su T helperiu, vyksta tolesnė T limfocitų proliferacija ir diferenciacija, aktyvintas T helperis skatina B limfocitus diferencijuotis į plazmines ląsteles ir gaminti antikūnus prieš transplantato ŽLA antigenus, o ląstelinis imuninis atsakas skatina T limfocitų diferenciaciją į citotoksinius T limfocitus, NK ląsteles, kurie veikia citotoksiškai ir sukelia transplantato ląstelių lizę [34]. Taip pat produkuojami citokinai, mobilizuojantys kitas uždegimines ląsteles į persodintą organą. Galiausiai sukeliamas persodinto organo nekrozė.

Lėtinė transplantato atmetimo reakcija paprastai vyksta praėjus daugiau laiko nuo organo persodinimo. Jos metu proliferuoja lygiųjų raumenų ląstelės, fibroblastai gamina kolageną, taip skatinama transplantato arteriosklerozė ir audinio fibrozė, vedanti prie organo išemijos ir ląstelių žūties. Lėtinė transplantato atmetimo reakcija skirstoma į lėtinę aktyvią ląstelinę ir lėtinę aktyvią antikūnų sukeltą transplantato atmetimo reakciją [35]. Pastarajai būdinga transplantato glomerulopatija bei ryškus peritubulinių kapiliarų bazinės membranos sudvigubėjimas, progresuojanti arterijų intimos fibrozė [36]. O lėtinė aktyvi ląstelinė atmetimo reakcija apibūdinama kaip intersticinės fibrozės ir kanalėlių atrofijos apimto žievės ploto uždegimas, taip pat uždegiminė infiltracija transplantato kanalėliuose.

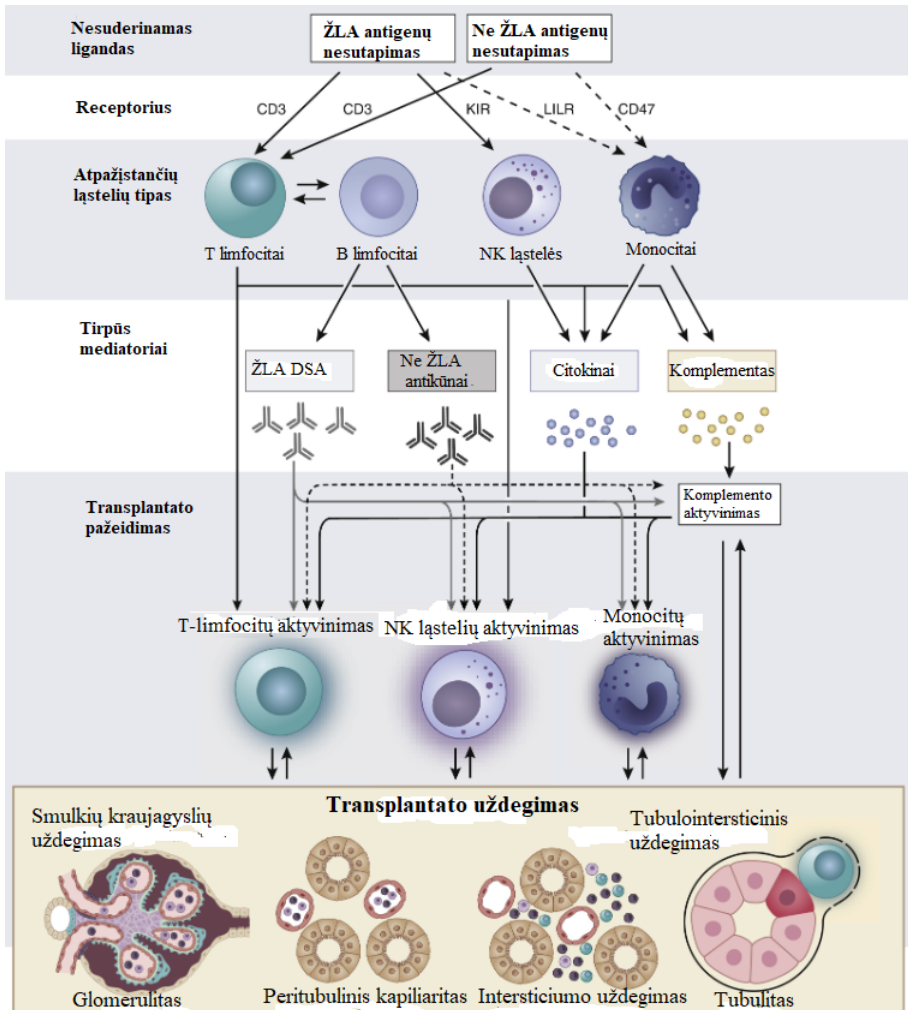
### 1.3.2.3. Ląstelinė ir antikūnų sukelta atmetimo reakcija

Ilgą laiką atmetimo reakcijos pagal imuninio atsako mechanizmą buvo skirstomos pagal griežtą dichotominį požiūrį į ląstelinę ir antikūnų sukelimą atmetimo reakciją.

Ląstelinės atmetimo reakcijos metu T helperiai aktyvina citotoksinius T limfocitus, makrofagus [37]. Citotoksiniai T limfocitai išskiria perforinus, granzimus ir kitas citotoksines molekules arba per Fas ligandą veikia svetim organo ląstelių Fas receptorius ir šitaip jas sunaikina. Transplantuoto inksto audinyje ląstelinės atmetimo reakcijos atveju matomas tubulitas, intersticiumo infiltracija ir arterijų intimos, medijos ar transmuralinis uždegimas.

Antikūnų sukelta ūminė atmetimo reakcija vyksta dėl imuninio atsako prieš donoro ŽLA antigenus, gaminamus endotelio ląstelių [38]. Taip pat ši reakcija gali vykti ir kaip atsakas į ne ŽLA antigenus, tokius kaip ABO kraujo grupės antigenai, angiotenzino II tipo receptorius ir kt. T limfocitų aktyvinti B limfocitai virsta plazminėmis ląstelėmis, gaminančiomis antikūnus, kurie klasikiniu keliu aktyvina komplemento sistemą. Komplemento komponentai veikia kaip chemoatraktantai, pavyzdžiui, komplemento komponentai C3a ir C5a skatina neutrofilų ir makrofagų migraciją į uždegimo vietą. Be to, komplemento aktyvinimas sukelia vazospazmą per prostaglandino E2 išsiskyrimą iš makrofagų, o putliųjų ląstelių atpalaiduojamas histaminas skatina edemą. C3a ir C5a didina endotelio adhezijos molekulių, įvairių citokinų bei chemokinų išsiskyrimą. Komplemento aktyvinimo kaskados galutinis produktas C5b-9, vadinamasis membraną atakuojantis kompleksas, sukelia endotelio ląstelių lizę. Be to, antikūnai gali sukelti ląstelių pažeidimą per nuo komplemento nepriklausančius mechanizmus, mobilizuodami NK ląsteles bei makrofagus. Antikūnų sukulto atmetimo atveju transplantuoto inksto audinyje galima matyti T limfocitų, neutrofilų bei monocitų infiltraciją peritubuliniuose ir glomerulų kapiliaruose. Tubulitas paprastai nėra būdingas ir labiau atspindi kartu esantį ląstelinį atmetimo komponentą. Peritubuliniuose kapiliaruose dažnai matoma ir komplemento C4d komponento depozicija. Dėl antikūnų sukulto endotelio pažeidimo atpalaiduojamas von Willebrand faktorių, tai skatina trombocitų agregaciją ir mikrotrombų susidarymą. Koaguliacinės proteazės, tokios kaip trombinas, veikia endotelio proteazių aktyvinamus receptorius ir sukelia daugybės prouždegiminių citokinų sekreciją [16].

Atmetant transplantatą dalyvaujančios ląstelės, jų išskiriami mediatoriai ir sukelia skirtingų inksto audinio elementų pažeidimą pavaizduota 1 paveiksle.



1 paveikslas. Transplantato atmetimą išprovokuoja nesutapimas tarp donoro ir recipiento ŽLA arba ne ŽLA, kuriuos atpažįsta recipiento imuninės sistemos ląstelės. Šios sukelia tiesioginę inksto ląstelių pažeidą arba išskiria mediatorius, tokius kaip donorui specifiniai antikūnai (DSA), citokinai. Keli mechanizmai gali veikti sinergistiškai, sukeldami transplantato pažeidimą, dėl to papildomai atpalaiduojami prouždegiminiai veiksniai, skatinantys vietinį uždegiminį atsaką. Paveikslas parengtas pagal Callemeyn ir bendraautorių straipsnį [34].

Pastebėta, kad antikūnai, jungdamiesi su donoro audiniais, skatina paties donoro endotelines ląsteles ir monocitus išskirti citokinus, kurie pritraukia ir aktyvina įvairias imuninės sistemos ląsteles, galinčias sukelti tiesioginį transplantato pažeidimą ar sekretuoti dar daugiau citokinų [34]. Vienas iš

tokių citokinų ir yra CXCL10, išskiriamas endotelinų ląstelių, monocitų, ir skatinantis į uždegimo vietą judėti CXCR3+ NK ląsteles bei CXCR3+ T limfocitus [39].

Randama vis daugiau įrodymų, jog dalis vieno ar kito tipo reakcijos imuninių mechanizmų persidengia arba egzistuoja daugiau atmetimo tipų, dabar apimamų ląstelinės arba antikūnų sukeltos atmetimo reakcijos termino. Šią mintį grindžia molekulinio mikroskopo („Molecular Microscope Diagnostic System MMDx“) kūrėjų atradimai, kai buvo nustatyti skirtingi molekuliniai fenotipai vienodos histologinės atmetimo išraiškos preparatuose [34, 40–42].

### 1.3.3. Transplantato atmetimo diagnostika

#### 1.3.3.1. Transplantato atmetimo klinikinė išraiška

Inksto transplantato atmetimo klinikinė išraiška gali būti įvairi: vienais atvejais pacientas jokių simptomų gali nejaušti, tačiau laboratoriniais tyrimais nustatomas glomerulų filtracijos greičio mažėjimas, kitais atvejais pacientą gali varginti tempimo ar maudimo jausmas transplantato srityje, mažėti išskiriamo šlapimo kiekis, atsirasti tinimų, augti svoris dėl susikaupiančių skysčių, kartais – pasireikšti subfebrilus ar net febrilus karščiavimas [43]. Pacientą gali varginti bendras silpnumas, jėgų stoka, jam pablogėja hipertenzijos kontrolė, padidėja arterinio kraujo spaudimas. Didėjant ureminių rodiklių koncentracijai kraujo serume, gali pasireikšti apetito stoka, pykinimas, vėmimas.

Transplantato atmetimui taip pat labai būdinga proteinurija, padidėjęs baltymo ir kreatinino santykis šlapime [44].

Vis dėlto visi šie simptomai ir požymiai yra nespecifiniai, galintys pasireikšti ir esant transplantato infekcijai, grįžtamosioms glomerulopatijoms, transplantato kraujotakos sutrikimams ir kt., todėl diagnozei patvirtinti būtini papildomi tyrimai, kurių pagrindinis ir informatyviausias – inksto transplantato biopsija.

#### 1.3.3.2. Histologinė atmetimo diagnostika

1991 m. įvykęs pirmasis susitikimas Banfo mieste Kanadoje davė pagrindą vienai plačiausiai pasaulyje naudojamų patologijos klasifikacinių sistemų – Banfo transplantato patologijos klasifikacinei sistemai [45]. Ši klasifikacinė sistema vėliau nuolat buvo atnaujinama ir papildoma [18]. 2022 m. Banfo klasifikacinė sistema inksto transplantato histologinius pokyčius suskirsto į 6 kategorijas [19, 46]: 1. Normali histologija arba nespecifiniai pokyčiai. 2.

Antikūnų sukeltas atmetimas ir mikrokraujagyslinis uždegimas ir (ar) pažeidimas. 3. Paribinis ūminis ląstelinis atmetimas. 4. Ląstelinis atmetimas. 5. Intersticinė fibrozė ir (ar) kanalėlių atrofija; 6. Kiti pakitimai, nesusiję su ūminiu ar lėtiniu atmetimu.

Banfo klasifikacinė sistema balais vertina šiuos histologinius pakitimus:

i – uždegimas, vertinamas nesurandėjusiuose inksto žievės plotuose balais nuo 0 iki 3. Tai vienas iš ūminio ląstelinio atmetimo požymių.

t – tubulitas, inksto kanalėlių epitelio uždegimas, vertinamas balais nuo 0 iki 3.

v – arterijų intimos uždegimas, vertinamas balais nuo 0 iki 3. Šis uždegimas yra būdingas tiek ląsteliniam, tiek antikūnų sukeltam transplantato atmetimui.

g – glomerulitas. Glomerulų uždegimas – tai viena iš mikrovaskulinio uždegimo formų, jis būdingas antikūnų sukeltam transplantato atmetimui. Vertinama balais nuo 0 iki 3.

ptc – peritubulinių kapiliarų uždegimas, taip pat sudarantis mikrovaskulinį uždegimą, paprastai būdingą antikūnų sukeltam transplantato atmetimui – tiek aktyviam, tiek lėtiniam aktyviam. Vertinamas balais nuo 0 iki 3.

C4d – tai komplemento komponentas, kurio depozicija peritubuliniuose kapiliaruose išryškėja imunohistocheminės arba imunofluorescencinės reakcijos metu. Vertinamas balais nuo 0 iki 3.

ci – intersticiumo fibrozė, vertinama balais nuo 0 iki 3.

ct – kanalėlių atrofija, kuri paprastai būna labai susijusi su intersticiumo fibroze ir rodo lėtinius nespecifinius pakitimus transplantate bei koreliuoja su transplantato prognoze. Vertinama balais nuo 0 iki 3.

cv – vertina labiausiai paveiktos arterijos intimos sustorėjimą balais nuo 0 iki 3.

cg – glomerulų bazinės membranos sudvigubėjimas, vertinamas balais 0, 1a, 1b, 2, 3.

mm – mezangiumo matrikso išsiplėtimas, vertinamas balais nuo 0 iki 3.

ah – arteriolių hialinozė, vertinama balais nuo 0 iki 3.

aah – hialininis arteriolių sustorėjimas, vertinamas balais nuo 0 iki 3.

ti – totalinis uždegimas, kuris apibūdina bendro žievės uždegimo mastą ir yra vertinamas balais nuo 0 iki 3.

i-IFTA – uždegimas intersticinės fibrozės ir kanalėlių atrofijos apimtame plote. Vertinama balais nuo 0 iki 3. Lėtinis aktyvus ląstelinis atmetimas įtariamasis, kai i-IFTA surenka 2 ir daugiau balo.

t-IFTA – tubulitas intersticinės fibrozės apimtame plote. Vertinama balais nuo 0 iki 3.

pvl – poliomos viruso pažeidimą transplantate apibūdinantis rodiklis, vertinamas balais nuo 0 iki 3.

Inksto transplantate taip pat vertinami kiti galimi pakitimai, tokie kaip trombinė mikroangiopatija, rekurentinės glomerulopatijos požymiai, peritubulinių kapiliarų sudvigubėjimas, ūminė kanalėlių nekrozė ir kiti.

Balais įvertintų Banfo klasifikacinių kriterijų deriniai pagal klasifikacinės sistemos sudarytas taisykles leidžia priskirti pokyčius transplantate vienai ar kitai diagnostinei kategorijai.

Vadovaujantis Banfo 2022 diagnostiniais kriterijais, antikūnų sukeltas atmetimas skirstomas į aktyvų, lėtinį aktyvų arba lėtinį antikūnų sukeltą atmetimą [19].

Aktyvus antikūnų sukeltas atmetimas turi atitikti visus tris kriterijus:

1. Aktyvus histologinis pažeidimas – turi būti bent vienas iš šių pokyčių:
  - $g > 0$  ir (ar)  $ptc > 0$ , nesant pasikartojančios ar naujai atsiradusios glomerulopatijos. Tačiau esant ūminiam ląsteliniam atmetimui, paribiniams pokyčiams arba infekcijai, vien  $ptc > 1$  nepakanka ir  $g$  turėtų būti  $\geq 1$ ;
  - $v > 0$ ;
  - ūminė trombinė mikroangiopatija, nesant kitų jos priežasčių.
2. Bent vienas iš šių kriterijų:
  - linijinis C4d dažymasis peritubuliniuose kapiliaruose arba šerdinėse tiesiosiose arterijose;
  - $[g + ptc] \geq 2$  balai nesant grįžtamosios arba naujai atsiradusios glomerulopatijos. Tačiau esant ūminiam ląsteliniam atmetimui, paribiniams pokyčiams arba infekcijai, vien  $ptc \geq 2$  nepakanka, kartu  $g$  turi būti  $\geq 1$ ;
  - bioptato transkriptų ekspresija, būdinga antikūnų sukeltam atmetimui arba mikrokraujagysliniam pažeidimui.
3. Aptinkami donorui specifiniai antikūnai (prieš ŽLA arba kitus antigenus).

Lėtinis aktyvus antikūnų sukeltas atmetimas nustatomas, kai histologiniai pokyčiai atitinka visus šiuos 3 kriterijus:

1. Lėtinio antikūnų sukulto atmetimo histologiniai požymiai biopsijoje:
  - $cg > 0$ , kai nėra lėtinės TMA arba lėtinio rekurentinio ar naujai atsiradusio glomerulonefrito;
  - ženklus peritubulinio kapiliaro bazinės membranos sudvigubėjimas (nustatomas elektronine mikroskopija).
2. Bent vienas iš šių kriterijų:
  - linijinis C4d dažymasis peritubuliniuose kapiliaruose arba šerdinėse tiesiosiose arterijose;

–  $[g + ptc] \geq 2$  nesant grįžtamosios arba naujai atsiradusios glomerulopatijos. Tačiau esant ūminiam ląsteliniam atmetimui, paribiniams pokyčiams arba infekcijai, vien  $ptc \geq 2$  nepakanka,  $g$  turi būti  $\geq 1$ ;

– bioptato transkriptų ekspresija, būdinga antikūnų sukeltam atmetimui arba mikrokraujagysliniam pažeidimui.

3. Aptinkami donorui specifiniai antikūnai (prieš ŽLA arba kitus antigenus).

Lėtinis antikūnų sukeltas atmetimas nustatomas, kai inksto bioptatas atitinka visus šiuos tris diagnostinius kriterijus:

1.  $cg > 0$  ir (ar) ryškus peritubulinių kapiliarų bazinės membranos sudvigubėjimas.

2. Nėra antrojo kriterijaus, būdingo aktyviam ir lėtiniam antikūnų sukeltam atmetimui, požymių.

3. Anksčiau buvęs nustatytas aktyvus ar lėtinis aktyvus antikūnų sukeltas atmetimas ir (ar) anksčiau nustatyti ar dabar cirkuliuojantys donorui specifiniai antikūnai.

Atskirą kategoriją Banfo klasifikacijoje sudaro paribiniai pokyčiai, arba vadinamasis įtartinas ūminis ląstelinis atmetimas. Jis nustatomas, kai  $t > 0$  ir  $i = 1$  arba  $t1$  ir  $i \geq 2$ .

Ląstelinis atmetimas skirstomas į ūminį ir lėtinį aktyvų T limfocitų sukeltą atmetimą. Ūminis atmetimas savo ruožtu klasifikuojamas į atskiras klases pagal savo pasireiškimą šreikštumą:

IA klasės ląstelinis atmetimas:  $i \geq 2$  ir  $t2$ .

IB klasė:  $i \geq 2$  ir  $t3$ .

IIA klasė:  $v1$ , kad ir kokie būtų  $i$  ir  $t$ .

IIB klasė:  $v2$ , kad ir kokie būtų  $i$  ir  $t$ .

III klasė:  $v3$ , kad ir kokie būtų  $i$  ir  $t$ .

Lėtinis aktyvus ląstelinis atmetimas skirstomas į IA (kai  $t_i \geq 2$  ir  $i\text{-IFTA} \geq 2$  (nesant kitų priežasčių) ir  $t2$ ), IB ( $t_i \geq 2$  ir  $i$  ir  $i\text{-IFTA} \geq 2$  (nesant kitų priežasčių) ir  $t3$ ) ir II (arterijų intimos fibrozė su mononuklearinių ląstelių infiltracija fibrozės zonoje bei neointimos formavimusi).

Kanados mokslininkų grupė, vadovaujama prof. P. Hallorano, sukūrė molekulinio mikroskopo diagnostinę sistemą (MMDx) – tai sistema, kai bioptato mikrogardelėse tiriama įvairių transkriptų ekspresija, o šie rezultatai interpretuojami pasitelkus mašininio mokymo algoritmus [47]. Šis metodas ne tik leidžia tiksliau įvertinti abejotinus ir patologo interpretuojamus kaip

paribinius, neaiškius atvejus, bet ir pateikė naujų duomenų apie transplantato atmetimo tipus, patogenezę, pavyzdžiui, paaiškėjo, kad antikūnų sukeltas atmetimas neretai būna C4d neigiamas ir be aptinkamų donorui specifinių antikūnų [48].

Taigi inksto transplantato atmetimo diagnostikai būtina inksto biopsija, tačiau tai yra invazinis tyrimo būdas, galintis turėti komplikacijų, todėl šio tyrimo skyrimas turi būti pagrįstas objektyviu inksto transplantato atmetimo įtarimu [49]. Kai kuriose šalyse laikomasi „protokolinių“ biopsijų taktikos, kai per pirmuosius metus po inksto transplantacijos pacientui numatytais intervalais atliekamos transplantato biopsijos net ir nesant transplantato funkcijos pakitimų [50]. Šių biopsijų tikslas – nustatyti subklinikinį, tačiau histologiškai jau aptinkamą atmetimą. Vis dėlto tai labai invazinis būdas, todėl ieškoma alternatyvų, kaip neinvaziniais tyrimo būdais anksti įtarti subklinikinį transplantato atmetimą ir transplantato biopsijas daryti tik esant kitais būdais pagrįstam įtarimui dėl atmetimo. Vienas iš tokių neinvazinių diagnostikos būdų galėtų būti specifiniai biožymenys šlapime ar kraujyje.

#### 1.3.3.3. Donorui specifiniai antikūnai

Donorui specifiniai antikūnai – tai recipiento serume aptinkami antikūnai, kurie yra nukreipti prieš svetimus donoro antigenus. Šie antikūnai gali būti susiformavę dar iki transplantacijos po tam tikrų recipientą sensitizuojančių įvykių (nėštumo, kraujo perpylimo), tokie antikūnai gali duoti teigiamą kryžminę reakciją su donoro limfocitais, tada tokio donoro inksto transplantacija negalima, nes gali įvykti hiperūminė transplantato atmetimo reakcija. Donorui specifiniai antikūnai (DSA) gali naujai susiformuoti po transplantacijos, sąveikaujant recipiento imuninei sistemai su donorinio organo antigenais, kai pacientui skiriama nepakankama imunosupresija. Tokie *de novo* DSA nustatomi mikrosferų srauto analizės technologija, o antikūnų titras matuojamas vidutiniu fluorescenciniu intensyvumu (MFI – angl. *mean fluorescence intensity*). Padidėjęs DSA titras yra vienas iš antikūnų sukulto transplantato atmetimo diagnostinių kriterijų [19]. Tačiau DSA klinikinė reikšmė priklauso ir nuo paties antikūno savybių, tokių kaip IgG subklasė, nuo kurios priklauso gebėjimas fiksuoti komplementą ir per susijungimą su Fc receptoriais mobilizuoti efektorines ląsteles. IgG3 subklasės antikūnai efektyviau jungia C1q komplemento komponentą, aktyvina komplemento kaskadą klasikiniu būdu ir pagreitina antikūnų sukeltą transplantato atmetimą, o IgG4 subklasės DSA negeba fiksuoti komplemento ir imuninį atsaką skatina per Fc receptorių [51]. Vis dėlto vien DSA padidėjimas yra nepakankamas kriterijus diagnozuoti antikūnų sukeltą atmetimą, todėl būtina koreliacija su

transplantato histologinio tyrimo duomenimis [52]. Kita vertus, antikūnų sukeltas atmetimas gali būti diagnozuojamas ir kai DSA recipiento serume neaptinkami [53].

#### 1.3.3.4. Nauji transplantato atmetimo biožymenys

Be minėtų įprastų ir į diagnostinius atmetimo kriterijus įtrauktų transplantato atmetimo žymenų, mokslinėje literatūroje minima ir daugiau į klinikinę praktiką ateinančių transplantato atmetimo žymenų, nustatomų recipiento serume ar šlapime.

Vienas iš tokių perspektyvių žymenų – tai donoro kilmės neląstelinė DNR. Donoro kilmės neląstelinė DNR (dd-cf-DNA – angl. *donor derived cell free DNA*) – tai iš donorinio organo išsiskyrusi DNR, cirkuliuojanti recipiento kraujyje ir aptinkama kraujo serume polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu [54–56]. dd-cf-DNR koncentracija serume padidėja, esant transplantato pažeidimui ar atmetimui, dd-cf-DNR leidžia atskirti tuos pacientus, kuriems yra būtent transplantato atmetimas, be to, šio žymens koncentracija mažėja, kai atmetimo gydymas sėkmingas [24, 55, 57]. Vis dėlto dd-cf-DNR koncentracija gali padidėti ir esant transplantato poliomos BK viruso infekcijai, todėl norint atskirti šias skirtingai gydomas patologijas, būtina kartu atlikti ir poliomos BK viruso DNR koncentracijos kraujyje ar šlapime tyrimą [56]. Remiantis dd-cf-DNR tyrimo duomenimis įtarus transplantato atmetimą, diagnozei patvirtinti vis tiek reikalinga transplantuoto inksto biopsija. Transplantato atmetimui įtarti atliekamas būtent kraujo serumo dd-cf-DNR tyrimas, tačiau šlapime nustatomas dd-cf-DNR padidėjimas leidžia identifikuoti tuos pacientus, kuriems įvyksta poliomos BK viruso infekcijos reaktyvacija ir kuriems yra poliomos BK viruso nefropatija, o ne vien tik virurija ar viremija [58]. Taip pat yra duomenų, jog dd-cf-DNR padidėja ir įvairių transplantato infekcijų metu, nesant atmetimo [59]. Taigi dd-cf-DNR yra perspektyvus transplantato atmetimo žymuo, tačiau jam nustatyti reikalinga PGR metodika, paciento kraujo serumo paėmimas, taip pat žymens padidėjimas gali būti virusinės ar bakterinės transplantato infekcijos atvejais, kai reikalingas visiškai priešingas gydymas nei esant transplantato atmetimui.

Inksto transplantato atmetimui prognozuoti naudojami ir genų ekspresijos tyrimai. Vienas iš tokių – tai komercinis inkstų solidinio organo atsako testas (angl. *Kidney Solid-Organ Response Test* – kSORT) [60]. Šis testas buvo sukurtas identifikuoti recipientus, kuriems yra padidėjusi ūminio transplantato atmetimo rizika. Testas PGR metodu matuoja 17 genų, susijusių su transplantato atmetimu, mRNR ekspresiją ir pasižymi 93 % jautrumu ir

specifiškumu. Vis dėlto šis tyrimas neleidžia atskirti ląstelinio atmetimo nuo antikūnų sukkelto atmetimo.

Inksto transplantato atmetimą gali padėti įtarti ir pakitusi įvairių šlapimo mRNR molekulių ekspresija. Vienos iš tokių – tai perforino ir granzimo B mRNR: ūminį transplantato atmetimą nuo normos perforino mRNR leidžia atskirti 83 % jautrumu ir specifiškumu, o granzimo B mRNR – 79 % jautrumu ir 77 % specifiškumu [61]. Vis dėlto šių žymenų ekspresija gali pakisti ne vien esant atmetimui, bet ir kitų patologijų metu.

Kita diagnostinį potencialą turinti mRNR molekulė – tai šlapimo FOXP3 mRNR, atspindinti reguliacinių T limfocitų veiklą [62]. Pastebėta, kad FOXP3 mRNR koncentracija sumažėja, kai atmetimo metu padidėja serumo kreatinino koncentracija [63]. Be to, tiems pacientams, kurių FOXP3 koncentracija buvo didesnė, sėkmingai suvaldytas transplantato atmetimas.

Inksto transplantato išgyvenamumui klinikiniuose tyrimuose prognozuoti yra sukurta vadinamoji iBox skaičiuoklė, kuri apima įvairius komponentus: apskaičiuotą GFG, šlapimo baltymo ir kreatinino santykį, DSA vidutinį fluorescencinį intensyvumą (MFI), inksto transplantato biopsijos histologinio tyrimo Banfo balus [23]. Ši skaičiuoklė naudojama vertinti naujų imunosupresantų efektyvumą lyginant su standartine terapija 6–24 mėn. laikotarpiu po transplantacijos.

#### 1.3.4. Chemokinių apžvalga

Chemokinai – tai ląstelių gaminami signalą perduodantys baltymai, dalyvaujantys svarbiuose imuninio atsako procesuose, tokiuose kaip chemotaksis, ląstelių adhezija ir kt. [64, 65]. Graikų kalbos žodis *kinos* išvertus reiškia judėjimą. Chemokinai sudaro mažų, apie 8–14 kDa dydžio, struktūriškai panašų molekulių grupę ir įvairių leukocitų migraciją reguliuoja sąveikaudami su transmembraniniais su G baltymu susijusiais receptoriais.

##### 1.3.4.1. Chemokinių klasifikacija ir struktūra

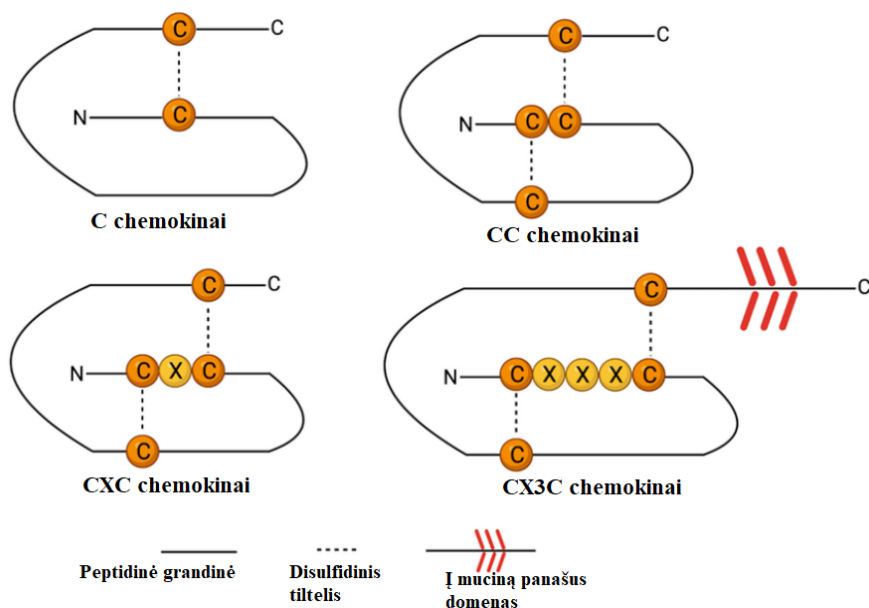
Nors ilgą laiką chemokinai buvo vadinami pagal tai, kokias funkcijas atlieka, 2000 m. buvo įvesta sisteminė chemokinių nomenklatūra, apimanti pošeimio pavadinimą (CC, CXC, CX3C, XC), toliau pridedant raidę L, reiškiančią „ligandas“, ir numerį, kuris priklauso nuo to, kada pirmausia buvo izoliuotas genas [66].

Chemokinių struktūros požymis yra keturios cisteino liekanos, kurios sudaro disulfidines jungtis, nepaprastai svarbias išlaikant trimatę chemokinių

formą (2 paveikslas). Cisteino išsidėstymas skirtinguose pošeimiuose nevienodas: CC chemokinių ( $\beta$  chemokinių) pošeimyje pirmosios dvi cisteino liekanos yra greta, CXC chemokinių pošeimyje ( $\alpha$  chemokinių) pirmosios dvi cisteino liekanos yra atskirtos viena aminorūgštimi, CX3C chemokinių pošeimyje tarp pirmųjų dviejų cisteino liekanų yra įsiterpusios trys aminorūgštys, o XC chemokinių pošėmis turi tik dvi cisteino liekanas: vieną N- gale ir kitą toliau [67].

Chemokinai paprastai būna monomerų pavidalo, tačiau gali formuoti oligomeras – pirmiausia dimerus, tačiau kartais ir tetramerus ar stambesnes struktūras. Dimerizacijos pobūdis yra skirtingas atskiruose chemokinių pošeimiuose: CXC chemokinai formuoja globulinius dimerus, pratęsdami savo  $\beta$  sluoksnius į šešiagrandes struktūras, o CC chemokinai labiau formuoja pailgus dimerus, sąveikaudami per N- galo sritį [68].

Chemokinai turi ir bendrų struktūrinių elementų, tokių kaip lankstų N galo regioną ir po jo einančią N kilpą, taip pat šerdinį domeną, sudarytą iš trigrandžių antiparalelinių  $\beta$  sluoksnių ir C galo  $\alpha$  spiralės. Chemokinams būdingas išsidėstymas primena „graikiško rakto“ formą būtent dėl sąveikos tarp cisteino liekanų [69].



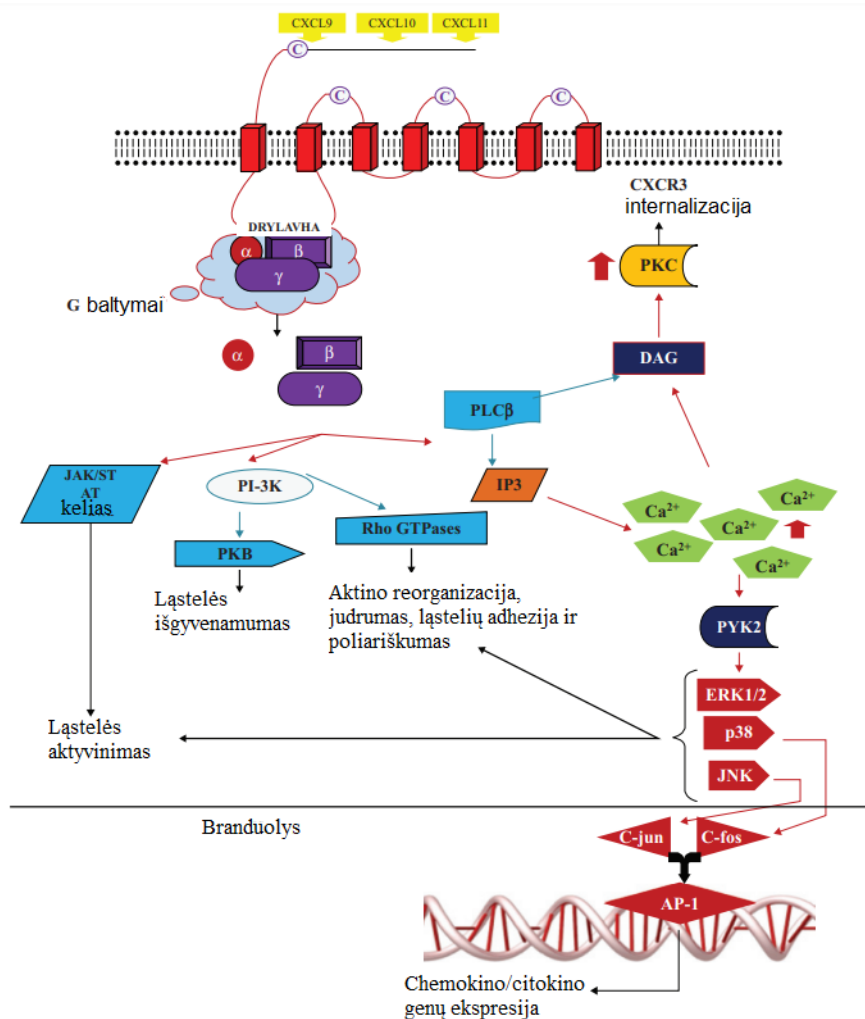
2 paveikslas. Chemokinių pošemių struktūra. Schemiškai pavaizduojamas cisteino (oranžiniai skrituliai) liekanų skaičius kiekvieno pošeimio chemokinuose. Geltonuose skrituliuose taip pat pavaizduotos nespecifinės aminorūgštys tarp N galo cisteinų. Paveikslas adaptuotas pagal A. Lekan ir L. Weiner straipsnį [70].

### 1.3.4.2. Chemokinių biologinė reikšmė

Pagal savo biologinį veikimą chemokinai gali būti skirstomi į dvi stambias kategorijas: homeostatiniai ir uždegiminiai chemokinai. Homeostatiniai chemokinai paprastai yra ekspresuojami konkrečiuose audiniuose ar organuose ir atlieka specifines funkcijas, tokias kaip ląstelių migracija. O štai uždegiminius chemokinus įvairios ląstelės (makrofagai, fibroblastai, T limfocitai) ima gausiai gaminti esant uždegimui ar kitam imuniniam stimului.

Pastaruoju metu labai susidomėta chemokinais CXCL9 ir CXCL10 kaip potencialiais transplantato atmetimo žymenimis. Šie žymenys tirti kraujo serume, šlapime, taip pat analizuota jų RNR, genų ekspresija [71, 72]. Vis dėlto šių chemokinių nustatymas būtent šlapime labiausiai atspindi inksto transplantato būklę, nes šlapimas yra tiesioginis šio organo produktas.

Tiek CXCL9, tiek CXCL10 veikia jungdamiesi su chemokinių receptoriais CXCR3, tiksliau, su jo izoforma CXCR3-A [73] (3 paveikslas). CXCR3 ekspresuojamas ant aktyvintų T limfocitų, NK ląstelių ir kai kurių epitelinių ląstelių [74, 75]. Kalbant apie T limfocitus, CXCR3 ekspresuojamas būtent ant Th1 ląstelių, todėl skatina selektyvią Th1 migraciją į uždegimo vietą [62]. CXCR3 sąveika su CXCL9, CXCL10 ir kitais chemokinais labai svarbi reguliuojant autoimuninį atsaką, priešvėžinį imunitetą ir imuninį atsaką į persodintą organą [76].



3 paveikslas. CXCR3 struktūra ir intraląsteliniai signalo perdavimo keliai. CXCR3 yra 7 transmembraninių domenų receptorius, kuris sąveikauja su chemokinais CXCL9, CXCL10, CXCL11 per ekstraląstelinį domeną, taip aktyvindamas intraląstelinį signalo perdavimą per G baltymus. Parengta pagal Zare-Bidaki ir bendraautorių straipsnį [77]. DRYLAHVA – pirmoji intraląstelinė kilpa; PI-3K – fosfoinozido-3 kinazė; PYK2 – prolino tirozino kinazė 2; PLC – fosfolipazė C; JNK – c-Jun-N galo kinazė; IP3 – trifosfoinozitolis; IP3 – trifosfoinozitolis; DAG – diacilglicerolis; PKC – proteinkinazė C; ERK1/2 – ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė; PKB – proteinkinazė B.

#### 1.3.4.3. CXCL9 ir CXCL10 klinikinė reikšmė

Chemokinas 9 (CXCL9), kitaip vadinamas monokinu, indukuotu gama interferono, veikia per CXCR3 receptorių ir skatina NK ląstelių, mononuklearų, specifiskai aktyvintų T limfocitų, B limfocitų migraciją [74, 75]. Transplantacijos atveju CXCL9 yra vienas svarbiausių T limfocitų migracijos mediatorių [78]. Gyvūnų modeliuose pastebėta, kad CXCL9 skatina T limfocitus gaminti citokinus ir skatina T helperių 1 (Th1) proliferaciją per transkripcijos faktorių T-bet ir ROR $\gamma$ T indukciją, taip pat 1 tipo citokinų (IL-2, TNF bei gama interferono) produkciją.

Chemokinas 10 (CXCL10) taip pat veikia per CXCR3 receptorių, aktyvindamas NK ląstelių, mononuklearų, T ir B limfocitų migraciją. Šis citokinas gaminamas strominėse ląstelėse tokių limfoidinių organų kaip blužnis, užkrūtis, limfmazgiai, taigi atlieka labai svarbų vaidmenį T limfocitų diferenciacijai ir efektorinėms funkcijoms. Gyvūnų modelių tyrimai rodo, kad tiek CXCL9, tiek CXCL10 koncentracija greitai padidėja esant transplantuoto organo reperfuzijai ir ankstyvam atmetimui [79–81]. Taip pat pastebėta, kad CXCL10 koncentracija padidėja esant įvairios etiologijos inksto transplantato kanalėlių ir intersticiumo uždegimui [82]. Yra duomenų, jog CXCL10 yra susijęs su klinikiu bei subklinikiu ląstelinio atmetimu, be to, nuo 2015 m. publikuota darbų, rodančių CXCL10 ryšį ne vien su ląstelinio, bet ir su antikūnų sukeltu atmetimu [64, 83–85].

Literatūroje publikuota darbų, tiriančių CXCL10 koncentracijos donoro serume įtaką uždelstai transplantato veiklai po persodinimo [86]. R. Maslauskienės ir bendraautorių duomenimis, nustatyta didesnė CXCL10 koncentracija išplėstinių kriterijų donorų serume, tačiau CXCL10 nebuvo susijęs su uždelsta transplantato veikla ir transplantato funkcija po trejų metų [87].

Atliekant klinikinius inksto transplantato recipientų tyrimus pastebėta, kad tiek CXCL9, tiek CXCL10 koncentracija šlapime padidėja, esant ląsteliniam arba antikūnų sukeltam inksto transplantato atmetimui [84, 85, 88]. Taikant transplantato atmetimo gydymą, šių chemokinų koncentracija šlapime ima mažėti [71, 89]. Taip pat pastebėta, jog padidėjusi CXCL10 koncentracija šlapime rodo padidėjusią inksto transplantato atmetimo riziką ateityje, tačiau duomenys apie padidėjusios CXCL10 koncentracijos kraujo serume ir transplantato rizikos ryšį yra nevienareikšmiai, nes CXCL10 koncentracijos padidėjimą kraujyje gali lemti daugiau klinikinių veiksnių [90, 91]. Yra žinoma, kad tiek CXCL9, tiek CXCL10 nėra specifiniai atmetimo žymenys, nes jų koncentracija šlapime ir serume gali padidėti esant poliomos BK viruso, šlapimo takų infekcijai, o infekuotiesiems CMV padidėja šių chemokinų

koncentracija serume, tačiau ne šlapime [64, 89, 92–94]. Publikacijų apie chemokinių CXCL9 ir CXCL10 reikšmę inkstų transplantacijoje pagrindinės išvados pateikiamos 1 lentelėje.

1 lentelė. Publikacijos, nagrinėjusios chemokinių CXCL9 ir CXCL10 reikšmę inkstų transplantacijoje, ir jų pagrindinės išvados.

| Autorius                       | Metai | Tyrimo išvados                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lazzeri E. ir kt. [90]         | 2005  | Serumo CXCL10 koncentracija > 150 pg/ml prieš transplantaciją rodo padidėjusią ankstyvo sunkaus ūminio transplantato atmetimo riziką                                                        |
| Schaub S. ir kt. [83]          | 2009  | Šlapimo CXCL9 ir CXCL10 koncentracija koreliuoja su subklinikiniu transplantato kanalėlių pažeidimu                                                                                         |
| Rotondi M. ir kt. [95]         | 2010  | Serumo CXCL9 koncentracija prieš transplantaciją buvo susijusi su ūminio atmetimo rizika po transplantacijos                                                                                |
| Heidt S. ir kt. [91]           | 2011  | CXCL9 ir CXCL10 koncentracija serume neturi ūminio atmetimo prognostinės reikšmės pacientams, kuriems buvo skirta indukcinė imunosupresija                                                  |
| Jackson J. A. ir kt. [92]      | 2011  | CXCL9 ir CXCL10 koncentracija šlapime buvo padidėjusi esant ūminiam inksto transplantato atmetimui arba poliomos BK viruso infekcijai                                                       |
| Hricik D. E. ir kt. [96]       | 2013  | Esant ūminiam transplantato pažeidimui, maža CXCL9 koncentracija šlapime leidžia atmesti infekcines bei imunologines pažeidimo priežastis                                                   |
| Hirt-Minkowski P. ir kt. [97]  | 2015  | Šlapimo CXCL10 koncentracija po 6 mėn. nuo transplantacijos buvo susijusi su ilgalaikiu transplantato išgyvenamumu                                                                          |
| Blydt-Hansen T. D. ir kt. [88] | 2015  | Šlapimo CXCL10/kre yra susijęs su mikrokraujagysliniu uždegimu ir yra jautrus ir specifiškas subklinikinio ir klinikinio ląstelinio inksto transplantato atmetimo žymuo vaikų populiacijoje |
| Rabant M. ir kt. [85]          | 2015  | Šlapimo CXCL10 koncentracija buvo susijusi su transplantato tubulointersticiniu ir smulkiųjų kraujagyslių uždegimu                                                                          |
| Rabant M. ir kt. [89]          | 2016  | Maža CXCL10 koncentracija ankstyvuojų potransplantaciniu laikotarpiu susijusi su maža subklinikinio ir klinikinio transplantato atmetimo tikimybe                                           |
| Raza A. ir kt. [98]            | 2017  | CXCL10 koncentracija šlapime padidėja esant inksto transplantato atmetimui                                                                                                                  |

| Autorius                       | Metai | Tyrimo išvados                                                                                                                                                           |
|--------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Millan O. ir kt. [71]          | 2017  | Šlapimo CXCL10 koncentracija padidėjo prieš ir per ūminį transplantato atmetimą                                                                                          |
| Faddoul G. ir kt. [99]         | 2018  | CXCL9 koncentracija šlapime prieš transplantaciją ir ankstyvuojų potransplantaciniu laikotarpiu buvo susijusi su transplantato išėjimu po dvejų metų                     |
| Ho J. ir kt. [64]              | 2018  | CXCL10 koncentracija šlapime atspindi subklinikinį kanalėlių ir intersticiumo bei peritubulinių kapiliarų uždegimą, tačiau nerodo kraujagyslinio uždegimo                |
| Ciftci H. S. ir kt. [100]      | 2019  | Šlapimo CXCL9 ir CXCL10 koncentracija leidžia prognozuoti ląstelinį atmetimą ankstyvuojų potransplantaciniu laikotarpiu                                                  |
| Mühlbacher J. ir kt. [72]      | 2020  | Šlapimo CXCL9 kartu su DSA leidžia diagnozuoti subklinikinį antikūnų sukeltą inksto transplantato atmetimą vėlyvuojų potransplantaciniu laikotarpiu                      |
| Weselslindtner L. ir kt. [101] | 2020  | CXCL10 koncentracija buvo susijusi su poliomos BK viruso nefropatijos išreikštumu                                                                                        |
| Yan L. ir kt. [102]            | 2021  | Serumo CXCL9 koncentracija 30-ą dieną po transplantacijos buvo susijusi su infekcija per 1 metus po transplantacijos                                                     |
| Blydt-Hansen T. D. ir kt. [88] | 2021  | Padidėjęs CXCL10/kre koreliavo su mažesniu GFG po 1 metų nuo transplantacijos ir leido numatyti ūminį transplantato atmetimą 4 savaitės prieš jį patvirtinančią biopsiją |
| Arnau A. ir kt. [103]          | 2021  | DSA buvo susiję su padidėjusia CXCL10 koncentracija šlapime. CXCL10 yra potencialus antikūnų sukulto ir ląstelinio atmetimo žymuo inkstų transplantacijoje               |
| San Segundo D. ir kt. [104]    | 2022  | Šlapimo CXCL10 koncentracija buvo susijusi su ŽLA DQ lokuso epletų nesuderinamumu                                                                                        |
| Mayer K. A. ir kt. [56]        | 2022  | Poliomos BK viruso nefropatijai būdinga padidėjusi CXCL9 ir CXCL10 koncentracija šlapime, šis padidėjimas būna panašus ir atmetimo atveju                                |
| Moledina D. G. ir kt. [105]    | 2023  | CXCL9 koncentracija šlapime padidėja esant ūminiam intersticiniam nefritui                                                                                               |
| Duijl T. T. ir kt. [106]       | 2023  | Išeminis – reperfuzinis pažeidimas buvo susijęs su padidėjusia šlapimo CXCL9 koncentracija pacientams po inksto transplantacijos                                         |
| Haller J. ir kt. [107]         | 2023  | Šlapimo CXCL10 koncentracija labai padidėja esant poliomos BK virurijai ir dar labiau – viremijai. Maža CXCL10 koncentracija leidžia atmesti poliomos BK viremiją        |

| Autorius                       | Metai | Tyrimo išvados                                                                                                                                                                                       |
|--------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hirt-Minkowski P. ir kt. [108] | 2023  | Studija neparodė, kad šlapimo CXCL10 stebėseną turėtų įtakos vienerių metų transplantato išgyvenamumui                                                                                               |
| Van Loon E. ir kt. [109]       | 2024  | Šlapimo chemokinai CXCL9 ir CXCL10 kartu su klinikiniais duomenimis leidžia diagnozuoti ūminį inksto transplantato atmetimą ir gali sumažinti atliekamų biopsijų skaičių                             |
| Maslauskienė R. ir kt. [87]    | 2024  | Serumo CXCL10 koncentracija nesiskyrė uždelstos ir normalios transplantato veiklos grupėse                                                                                                           |
| Barrett-Chan E. ir kt. [110]   | 2024  | Šlapimo CXCL10/kre rodo inksto transplantato uždegimą vaikų populiacijoje, tyrimo duomenų pagrindu rekomenduojama atlikti du CXCL10 testus priimant sprendimą dėl indikacijų transplantato biopsijai |

### 1.3.5. Poliomos BK viruso nefropatija

Poliomos BK viruso nefropatija yra dar viena inksto transplantato patologija, kurios atveju padidėja chemokinių CXCL9 ir CXCL10 koncentracija šlapime [56]. Poliomos BK virusas – tai DNR virusas, priklausantis Polyomaviridae šeimai [111]. Žmonių populiacijoje šis virusas labai paplitęs: apie 90 % vaikų iki 4 m. yra persirgę šio viruso sukeliama infekcija [112]. Paprastai ji pasireiškia viršutinių kvėpavimo takų uždegimo požymiais, o pasibaigus aktyvios infekcijos laikotarpiui, virusas persistuoja inkstų ir uroepitelio ląstelėse visą gyvenimą, todėl, esant imunosupresinei būklei, gali reaktyvuotis, sukeldamas viruriją, viremiją ir galiausiai transplantuoto inksto nepakankamumą [113]. Kadangi klinikinis BK viruso nefropatijos pasireiškimas nėra labai specifiškas, apimantis hematuriją ir transplantato funkcijos blogėjimą, BK viruso infekcija diagnozuojama PGR metodika, nustatant viruso kopijų kiekį kraujo serume ar šlapime, o BK viruso nefropatija patvirtinama inksto biopsijos metodu, kai specifiniu SV40 dažymu nudažius preparatą, gaunama teigiama imunohistocheminė reakcija [114]. Taigi esant chemokinių CXCL9 ir CXCL10 koncentracijos padidėjimui šlapime, prasminga atlikti ir poliomos BK viruso PGR, kad būtų įvertinta, ar chemokinių koncentracijos padidėjimas nėra dėl poliomos BK viruso infekcijos.

### 1.3.6. Išvestiniai bendro kraujo tyrimo rodiklių indeksai

Išvestiniai bendro kraujo tyrimo rodiklių indeksai šiame darbe apskaičiuoti remiantis formulėmis, naudojamomis taikant endobiogenikos metodą [115–

119]. Šį metodą XX amžiaus pabaigoje sukūrė prancūzų gydytojas Kristianas Durafuras (Christian Duraffourd) [120]. Jo mokinys Žanas-Klodus Laprazas (Jean-Claude Lapraz) patentavo indeksų sistemą, kuria pagal įvairių kraujo tyrimų rodiklius vertinama žmogaus endokrininės sistemos veikla (patento nr. US2016/0132655A1).

Endobiogenika remiasi principu, kad organizmas turi savo įgimtus reguliavimo mechanizmus, kurie siekia išlaikyti pusiausvyrą ir optimalų funkcionavimą. Šios reguliavimo sistemos apima endokrininę sistemą (hormoninis reguliavimas), nervų sistemą (neuromediatorių reguliavimas) ir imuninę sistemą (imuninio atsako reguliavimas).

Taikant endobiogenikos metodą, paciento būklei vertinti naudojami ne tik apklausa, fizinis paciento ištyrimas, bet ir funkcijų biologijos indeksai – tai pagal bendro kraujo ir kai kurių biocheminio kraujo tyrimų rodiklius apskaičiuoti indeksai, interpretuojami funkcijų biologijos kontekste [116]. Vis dėlto metodo autoriai rekomenduoja indeksus interpretuoti atsižvelgiant į bendrą paciento sveikatos būklės kontekstą ir vertinant ne kiekvieną indeksą pavieniui, o atsižvelgiant į kitų indeksų pokyčius bei fizinio ištyrimo duomenis.

Lietuvoje endobiogenika yra priskiriama pirminės asmens sveikatos priežiūros natūraliosios ir liaudies medicinos srities biologinio poveikio paslaugų grupei, ją praktikuojantys asmenys turi turėti endobiogenikos specialisto licenciją [121]. Nors endobiogenikos metodas yra taikomas praktikoje, tačiau mokslinių straipsnių, pagrindžiančių šio metodo teiginius, yra labai nedaug. Taip pat trūksta duomenų apie pacientų populiacijas, kurių duomenimis remiantis buvo kuriamas šis metodas.

Kadangi endobiogenikos metodo naudojami indeksai yra lengvai apskaičiuojami iš rutiniškai atliekamų kraujo tyrimų rodiklių, dėl indeksų paprastumo ir prieinamumo kasdienėje praktikoje bei teorinio ryšio su biologinėmis organizmo funkcijomis norėjome įvertinti, ar jų duomenys galėtų turėti vertės diagnozuojant inksto transplantato atmetimą ar vertinant prognozę. Be to, indeksai jau yra naudojami endobiogenikos specialisto praktikoje labai įvairioms pacientų grupėms, todėl norėjome apžvelgti, kokios yra indeksų reikšmių tendencijos būtent pacientams, kuriems atlikta transplantacija ir kurių organizmą, taip pat indeksų reikšmės neabejotinai veikia daug papildomų veiksmų, tokių kaip imunosupresantų vartojimas, sumažėjęs glomerulų filtracijos greitis ir kiti, o duomenų apie indeksų pokyčius tokiomis sąlygomis iš viso nėra.

## 2. MOKSLINIO DARBO NAUJUMAS

Šis mokslinis darbas nagrinėja chemokinių CXCL9 ir CXCL10 reikšmę inksto transplantato atmetimo diagnostikai ir prognozei. Nors jau publikuota nemažai darbų šia tema, tačiau plačiau buvo nagrinėtas šlapimo chemokinas CXCL10 kaip potencialus žymuo transplantato atmetimui diagnozuoti, o apie CXCL9 literatūroje duomenų yra mažiau. Šiame darbe tai pačiai pacientų kohortai tirti abu žymenys, tiek CXCL9, tiek CXCL10, todėl darbas papildo esamus duomenis palyginamosiomis abiejų chemokinių charakteristikomis. Be to, pateikiama papildomų įžvalgų apie šių žymenų įtaką transplantato išgyvenamumui.

Visiškai nauja ir iki šiol kitų autorių nenagrinėta tema, gvildinama viename iš šio darbo uždavinių, – išvestinių bendro kraujo rodiklių indeksų ryšys su chemokinais CXCL9 bei CXCL10 ir transplantato atmetimu. Mūsų duomenimis, kol kas yra publikuota tik keletas straipsnių apie tokių indeksų ryšį su įvairiomis patologijomis [117, 119], tačiau dar niekada šie indeksai nebuvo nagrinėti pacientams po inksto persodinimo, taip pat nėra jokių duomenų apie indeksų ryšį su šlapimo chemokinais CXCL9 ir CXCL10. Kadangi pacientų vartojama imunosupresija gali turėti didelę įtaką indeksų reikšmėms, darbas pateikia vertingų duomenų, keičiančių šių indeksų interpretavimą būtent imunosupresuotų pacientų populiacijoje.

### 3. MOKSLINIO DARBO UŽDAVINIAI

Suformuluoti šie mokslinio darbo uždaviniai:

- I – Įvertinti šlapimo biožymenų CXCL9 ir CXCL10 savybes diagnozuojant histologiškai patvirtintą inksto transplantato atmetimą.
- II – Išnagrinėti CXCL9 ir CXCL10 ryšį su atskirais histologiniais pakitimais pagal Banfo klasifikacinę sistemą.
- III – Įvertinti chemokinų CXCL9 ir CXCL10 ryšį su kitomis inksto transplantato patologijomis (poliomos BK viruso infekcija, rekurentiniu glomerulonefritu).
- IV – Įvertinti CXCL9 ir CXCL10 įtaką inksto transplantato prognozei.
- V – Išnagrinėti išvestinių bendro kraujo rodiklių indeksų ryšį su chemokinais CXCL9 bei CXCL10 ir transplantato atmetimu bei prognoze.

## 4. METODIKA

### Tyrimo etika

Tyrimas buvo atliktas vadovaujantis Helsinkio deklaracija. Šiam moksliniam darbui atlikti buvo suteiktas Vilniaus regioninio bioetikos komiteto leidimas Nr. 158200-17-901-409. Visi į tyrimą įtraukti pacientai savanoriškai sutiko dalyvauti biomedicininiam tyrimo ir pasirašė informuoto asmens sutikimo formą.

### Tiriamieji

Į biomedicininį tyrimą buvo įtraukta 117 pacientų, kuriems VULSK Nefrologijos centre buvo atliekama transplantuoto inksto biopsija.

#### Pacientų įtraukimo kriterijai:

- amžius  $\geq 18$  m.
- atliekama protokolinė arba indikacinė transplantuoto inksto biopsija.

#### Pacientų neįtraukimo kriterijai:

- anurija;
- iki transplantato biopsijos nepaimtas šlapimo mėginys;
- neinformatyvus histologinis transplantuoto inksto tyrimas (bioptatu paimtas tik šerdinis inksto audinys, bioptate nėra glomerulų).

Į tyrimą įtrauktiems ir informuoto asmens sutikimo formą pasirašiusiems pacientams prieš transplantato biopsiją buvo duodamas indas vienkartiniam vidurinės šlapimo porcijos mėginiui surinkti. Surinkto šlapimo mėginys buvo perpilamas į mažesnius 3–10 ml mėgintuvėlius be priedų, mėgintuvėliai centrifuguojami, užšaldomi ir saugomi  $-20^{\circ}\text{C}$  temperatūroje.

### Inksto transplantato biopsija

Inksto transplantato biopsija buvo atliekama vietiškai nuskausminus, per odą įduriant 18-o dydžio adatą, kurios eiga stebima ultragarsu. Biopsijos metu buvo paimami vienas arba du inkstų audinio stulpeliai ir fiksuojami formalino tirpalu. Mėginiai nedelsiant buvo siunčiami į Valstybinį patologijos centrą, kur toliau ruošiami, atliekama šviesinė mikroskopija, imunohistocheminis tyrimas ir, jei reikia, elektroninė mikroskopija. Inksto biopsijos buvo

vertinamos patologo pagal tuo metu galiojančius naujausius Banfo klasifikacinius kriterijus.

25 (21 %) inksto transplantato biopsijos buvo protokolinės, likusios biopsijos – indikacinės. Inksto transplantato biopsijos indikacijos buvo tokios: dėl neaiškios priežasties blogėjanti transplantato veikla, įtariamas inksto transplantato atmetimas, nefrozinis sindromas. Protokolinės biopsijos buvo atliekamos pacientams po 3, 6 arba 12 mėn. nuo transplantacijos, esant stabiliai transplantato veiklai.

### Chemokinių nustatymas

Šlapimo chemokinių CXCL9 ir CXCL10 koncentracijos matavimai iš sukaupytų šaldytų mėginių atlikti retrospektyviai VU Gyvybės mokslų centre ELISA metodika. Naudoti komerciniai chemokinių nustatymo rinkiniai „Human MIG (CXCL9) Mini ABTS ELISA Development Kit“ (Peprotech, Catalog #900-M87) ir –Human IP-10 (CXCL10) Mini ABTS ELISA Development Kit“ (Peprotech, Catalog #900-M39). Visos tyrimo procedūros atliktos pagal gamintojo rekomendacijas, naudojant ELISA reagentus, esančius rinkinyje „ABTS ELISA Buffer Kit“ (Peprotech, Catalog #900-K00).

CXCL9 koncentracijos matavimui ELISA plokštelės šulinėliai kambario temperatūroje per naktį buvo padengti 1 µg/mL triušio antikūnais prieš žmogaus MIG (CXCL9), o CXCL10 koncentracijai matuoti šulinėliai padengti 0,5 µg/mL triušio antikūnais prieš žmogaus IP-10 (CXCL10) antigeną, tada perplauti ir užblokuoti. Kiekvienas šlapimo mėginys (po 100 µL kiekviename šulinėlyje) ir ELISA rinkinio standartas buvo testuojami tris kartus inkubuojant 2 val. kambario temperatūroje. Nuplovus pridėta biotinilintų triušio antrinių polikloninių antikūnų prieš žmogaus CXCL9 (1 µg/mL) arba prieš žmogaus CXCL10 (0,25 µg/mL) ir inkubuota 2 val. kambario temperatūroje. Tada plokštelės nuplaautos ir kambario temperatūroje inkubuotos su avidino ir krienų peroksidazės konjugatu 30 min. Nuplovus signalas gautas panaudojus ABTS substratą, inkubuojant 25 min. CXCL9 aptikti ir 20 min. CXCL10 aptikti. Optinis tankis (OD) buvo nuskaitytas esant 405 nm, o bangos ilgio korekcija nustatyta ties 650 nm, naudojant „Multiskan GO“ spektrofotometrą („Thermo Scientific“). CXCL9 ir CXCL10 koncentracijos apskaičiuotos iš standartinių kreivių, naudojant 4 parametrų logistinio modelio kreivę, esančią „OriginPro 8“ („OriginLab“) programoje. Abiejų chemokinių aptikimo ribos buvo 16–1000 pg/ml. Tie šlapimo mėginiai, kurių optinis tankis viršijo 1000 pg/ml standarto optinį tankį, buvo praskiedžiami ir tiriami pakartotinai.

Kad chemokinių koncentracijų neiškreiptų skirtingas šlapimo koncentruotumas, CXCL9 ir CXCL10 koncentracijos toliau pateikiamos susiejus su to šlapimo mėginio kreatinino koncentracija (chemokino konc. ng/kreatinino konc. mmol) ir žymimos CXCL9/kre bei CXCL10/kre.

### Imunosupresinis gydymas

Pacientai, atliekant biopsiją, vartojo palaikomąją imunosupresiją, standartiškai susidedančią iš kalcineurino inhibitorių (takrolimo arba ciklosporino), antimetabolitų (mofetilio mikofenolato arba azatioprino) ir kortikosteroidų (metilprednizolono). 7,7 % recipientų vartojo tik du imunosupresantus, tarp kurių nebuvo kortikosteroidų. 7,7 % recipientų vietoj kalcineurino inhibitorių vartojo mTOR inhibitorių sirolimą.

Indukcinė imunosupresija buvo skirta prieš transplantaciją atsižvelgiant į imunologinės rizikos grupę: kai kuriems įprastinės imunologinės rizikos ir visiems vidutinės imunologinės rizikos grupės pacientams buvo skiriamas baziliksimabas, o didelės imunologinės rizikos grupės recipientams – antitimocitinis globulinas.

### Klinikiniai duomenys

Pacientų demografiniai ir klinikiniai duomenys buvo renkami retrospektyviai iš elektroninės VULSK pacientų ligos istorijos (Eli) duomenų bazės. Klinikiniai ir demografiniai duomenys apėmė pacientų amžių, lytį, transplantacijos datą, ankstesnių transplantacijų skaičių, bendro kraujo, biocheminių kraujo tyrimų, histologinio tyrimo rezultatus, vartojamą imunosupresiją, persirgtas infekcines ligas, dializių pradžią ar mirties datą. Klinikiniai duomenys buvo suvedami į „MS Excel“ („Office 16“, „Microsoft“) programą ir perkelti į SPSS (SPSS 29.0, Inc, Chicago, IL, USA) statistinę programą.

### Statistinė analizė

Kiekybiniai kintamieji buvo tikrinami dėl normaliojo pasiskirstymo lyginant medianas ir vidurkius, vertinant asimetrijos ir eksceso koeficientus bei vizualiai peržiūrint histogramas. Jei kintamieji buvo pasiskirstę pagal normalųjį dėsnį, tada pateikėme vidurkį ir standartinį nuokrypį (SD), o jei kintamųjų skirstinys neatitiko normaliojo skirstinio, pateikėme medianą ir interkvartilinį periodą [IKP]. Kai kurie nepasiskirstę pagal normalųjį skirstinį kintamieji tolesnei analizei naudoti pritaikius logaritminę transformaciją.

Kokybiniai kintamieji pateikti dažniais. Duomenys buvo vertinti dėl išskirčių, pastebint ekstremaliąsias vertes ( $< 0,005$  ir  $> 0,995$  kvintilės).

Lyginant dvi grupes tarpusavyje, taikytas Studento  $t$  testas (normalaus skirstinio atveju) ir Mano ir Vitnio (Mann–Whitney)  $U$  testas (esant nenormaliam pasiskirstymui). Lyginant daugiau nei dvi nepriklausomas grupes, pasitelktas ANOVA arba Kruskalo ir Voliso (Kruskal–Wallis) testas priklausomai nuo skirstinio. Lyginant proporcijas tarp dviejų ar daugiau grupių, skaičiuotas chi kvadratas.

Koreliacijos tarp kintamųjų vertintos skaičiuojant Pirsono (Pearson) (normaliajam skirstiniui) arba Spirmeno (Spearman) (nenormaliajam skirstiniui) koreliacijos koeficientus.

Susijusiems histologiniams parametrų identifikuoti atlikta hierarchinė klasterinė analizė.

Žymenų įtakai inksto transplantato atmetimo diagnozei įvertinti pasitelkta logistinė regresija.

Biožymenų gebėjimas atskirti transplantato atmetimą nuo kitos patologijos ar normos vertintas braižant ROC kreives ir skaičiuojant plotą po kreive (AUC). Pagal ROC kreivę apskaičiuotas Jundeno indeksas, nustatant slenkstines biožymens vertes ir nustatant jautrumą bei specifiskumą.

Transplantatų išgyvenamumo analizei taikyta Kaplano ir Mejerio (Kaplan–Meier) metodika ir Kokso (Cox) regresinė analizė. Grupių išgyvenamumui palyginti naudotas log rank testas, įvairių veiksnių (recipiento lyties, amžiaus, kreatinino koncentracijos, KMI, histologinio tyrimo atsakymo, chemokinių koncentracijos, išvestinių indeksų) ryšys su transplantato funkcijos praradimo rizika vertintas pasitelkus Kokso regresijos metodą.

P reikšmė  $< 0,05$  laikyta statistiškai reikšminga. Statistiniai skaičiavimai atlikti SPSS programa 29.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

### Išvestiniai bendro kraujo tyrimo rodiklių indeksai

Išvestinius bendro kraujo tyrimo indeksus skaičiavome remdamiesi endobiogenikos metodo naudojamais funkcijų biologijos (angl. *Biology of Functions* – BoF) indeksais ir jų formulėmis [115–119]. Indeksai buvo apskaičiuoti tiriamiesiems pacientams pagal 1–7 dienos iki inksto biopsijos imto bendraklinikinio kraujo tyrimo rezultatus.

Darbe indeksai vadinami endobiogenikos metodo naudojamais šių indeksų pavadinimais, tačiau mokslinių įrodymų, siejančių indekso pavadinimą su jį reiškiančia biologine funkcija ar hormoniniu aktyvumu, yra labai negausu. Vis dėlto aiškumo dėlei darbe palikome originalius indeksų pavadinimus.

Dalis indeksų yra apskaičiuojami kaip dviejų bendro kraujo rodiklių santykis:

genito-tiroidinio santykio (GTS) indeksas: neutrofilai (%) dalinami iš limfocitų (%);

TRH reaktyvacijos indeksas: monocitai (%) dalinami iš limfocitų (%);

adaptacijos indeksas: eozinofilai (%) dalinami iš monocitų (%).

Kiti indeksai skaičiuojami įvedant papildomus koeficientus:

genitalinio santykio (GS) indeksas: eritrocitai (tūkstančiai/mm<sup>3</sup>)/(leukocitai (vnt./mm<sup>3</sup>) x 10e3);

leukocitų mobilizacijos indeksas (LMI): (trombocitai (vnt./mm<sup>3</sup>) × neutrofilai × hemoglobinas (g/dl))/(30 000 × leukocitai (vnt./mm<sup>3</sup>));

trombocitų mobilizacijos indeksas (TMI): trombocitai (vnt./mm<sup>3</sup>)/(60 × eritrocitai (tūkstančiai/mm<sup>3</sup>)).

Dar kiti indeksai skaičiuojami formulėje naudojant kitų indeksų reikšmes:

katabolizmo ir anabolizmo indeksas: GTS indeksas / (GS indeksas × Starterio indeksas);

antinksčių žievės indeksas: GTS indeksas / (GS indeksas)<sup>2</sup>

kortizolio indeksas: katabolizmo-anabolizmo indeksas / adaptacijos indeksas;

koreguotas genitalinio santykio (GS) indeksas: GS indeksas × Starterio indeksas;

Starterio indeksas: LMI/PMI.

## 5. REZULTATAI

### 5.1. Tiriamųjų charakteristika

Tiriamųjų imtį sudarė 117 inksto transplantato recipientų: 74 (63,2 %) vyrai ir 43 (36,8 %) moterys. Visi pacientai buvo kaukaziečių rasės, jų amžiaus vidurkis  $43 \pm 13$  metų. Transplantato biopsija atlikta vidutiniškai po 20 [IKP 6–96] mėnesių nuo inksto transplantacijos. Dauguma pacientų ( $n = 90$  (76,9 %)) buvo po pirmosios inksto transplantacijos, tačiau 22 (18,8 %) pacientai buvo po antrosios, o 5 (4,3 %) pacientai – po trečiosios inksto transplantacijos.

Vidutinis suminis laikas, kurį pacientas vartojo imunosupresantus, buvo 4,3 [IKP 1,0–11,0] metų (į šį laikotarpį įskaičiuotas ir imunosupresantų vartojimas iki transplantacijos dėl autoimuninės natyvinių inkstų ligos).

Pacientų charakteristika pateikta 2 lentelėje.

2 lentelė. Pacientų charakteristika ( $n = 117$ ).

|                                                                            |                                   |                  |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| Lytis                                                                      | Vyrai, n (%)                      | 74 (63,2)        |
|                                                                            | Moterys, n %                      | 43 (36,8)        |
| Amžius                                                                     | Vidutinis amžius, m.              | $43 \pm 13$      |
| aGFG biopsijos metu                                                        | ml/min./1,73 m <sup>2</sup>       | $39 \pm 18$      |
| Laikas nuo transplantacijos iki biopsijos                                  | Mediana, mėn. [IKP]               | 20,0 [6,0–96,0]  |
| Recipientų skaičius pagal vienam recipientui atliktų transplantacijų kieki | Pirma transplantacija: n (%)      | 90 (76,9)        |
|                                                                            | Antra transplantacija: n (%)      | 22 (18,8)        |
|                                                                            | Trečia transplantacija: n (%)     | 5 (4,3)          |
| Imunosupresijos trukmė                                                     | Mediana, m. [IKP]                 | 4,3 [1,0–11,0]   |
| Hemoglobino konc. biopsijos metu                                           | g/l                               | $115,8 \pm 19,8$ |
| KMI                                                                        | kg/m <sup>2</sup>                 | $24,7 \pm 4,8$   |
| Šlapalo konc. serume                                                       | mmol/l                            | $20,4 \pm 12,6$  |
| Transplantato biopsijos tipas                                              | Protokolinė biopsija, n (%)       | 25 (21,4 %)      |
|                                                                            | Indikacinė biopsija, n (%)        | 92 (78,6 %)      |
| Transplantato biopsijos rezultatai (% nuo visų biopsijų)                   | Normali histologija, %            | 22,2             |
|                                                                            | Antikūnų sukeltas atmetimas, %    | 21,4             |
|                                                                            | Ląstelinis atmetimas, %           | 7,7              |
|                                                                            | Mišrus atmetimas, %               | 8,5              |
|                                                                            | Poliomos BK viruso nefropatija, % | 4,3              |
|                                                                            | Kiti pakitimai, %                 | 35,9             |

|                                      |                                                  |             |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|
| Imunosupresija                       | Takrolimas, %                                    | 66,7        |
|                                      | Ciklosporinas, %                                 | 25,6        |
|                                      | Mofetilio mikofenolatas, %                       | 93,2        |
|                                      | Metilprednizolonas, %                            | 92,3        |
|                                      | Azatioprinas, %                                  | 2,6         |
|                                      | Sirolimus, %                                     | 7,7         |
| Imunosupresanto koncentracija serume | Takrolimas, ng/ml                                | 6,6 ± 3,8   |
|                                      | Ciklosporinas, ng/ml (prieš geriant vaisto dozę) | 84,7 ± 27,2 |
|                                      | Sirolimas, ng/ml                                 | 0,8 ± 0,7   |

## 5.2. Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 ryšys su klinikiniais duomenimis

Chemokinių CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijas koreliavome su pacientų klinikiniais ir demografiniais duomenimis. 3 lentelėje pateikiama chemokinių koreliacija su pagrindiniais duomenimis.

3 lentelė. CXCL9/kre ir CXCL10/kre koreliacija su recipientų pagrindiniais demografiniais ir klinikiniais duomenimis.

| Recipientų duomenys     | CXCL9/kre     |         | CXCL10/kre    |         |
|-------------------------|---------------|---------|---------------|---------|
|                         | r             | p       | r             | p       |
| Amžius                  | 0,079         | 0,398   | 0,057         | 0,545   |
| Lytis                   | -0,107        | 0,253   | -0,164        | 0,078   |
| KMI                     | -0,020        | 0,833   | 0,007         | 0,946   |
| Kreatinino konc. serume | <b>-0,513</b> | < 0,001 | <b>0,306</b>  | < 0,001 |
| Leukocitų sk. kraujyje  | <b>-0,226</b> | 0,017   | <b>-0,210</b> | 0,027   |
| Hemoglobino konc.       | <b>-0,388</b> | < 0,001 | <b>-0,202</b> | 0,033   |
| Monocitų proc.          | <b>-0,188</b> | 0,048   | -0,092        | 0,339   |
| Eozinofilų proc.        | 0,101         | 0,290   | <b>0,243</b>  | 0,010   |
| Trombocitų sk.          | -0,133        | 0,163   | -0,170        | 0,075   |
| Proteinurija            | <b>0,595</b>  | < 0,01  | <b>0,408</b>  | < 0,01  |

r – koreliacijos koeficientas; p vertė – reikšmingumo lygmuo.

CXCL9/kre ir CXCL10/kre reikšmingai koreliavo su proteinurijos dydžiu, kreatinino koncentracija kraujyje, hemoglobino koncentracija ir leukocitų skaičiumi kraujyje. Labai silpna koreliacija nustatyta tarp CXCL9/kre ir monocitų procento kraujyje, o silpna koreliacija tarp CXCL10/kre ir eozinofilų procento kraujyje.

### 5.2.1. I uždavinys: Šlapimo biožymenų CXCL9 ir CXCL10 savybių vertinimas diagnozuojant histologiškai patvirtintą inksto transplantato atmetimą

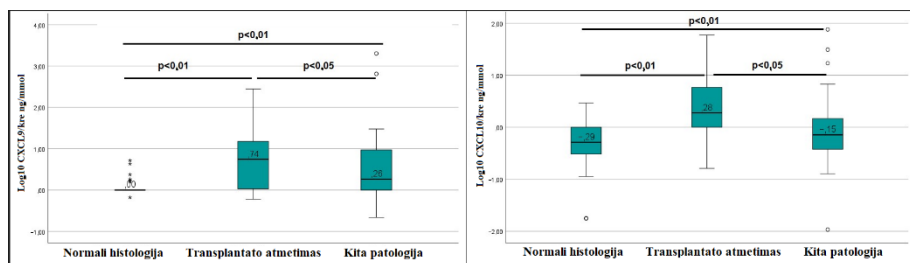
#### CXCL9/kre ir CXCL10/kre skirtingų atmetimo bei kitų histologinių diagnozių grupėse

Pacientai buvo suskirstyti į grupes pagal histologinio tyrimo radinius: atmetimo grupė (čia įtraukti tiek ląstelių sukelto, tiek humoralinio ar mišraus atmetimo atvejai, iš viso  $n = 44$ ), normalios histologijos grupė ( $n = 26$ ) ir kitų histologinių pokyčių (nesusijusių su atmetimu) grupė ( $n = 47$ ). Kadangi CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijos nebuvo pasiskirsčiusios pagal normalųjų skirstinį, kiekvienoje histologinėje grupėje skaičiuotos medianos bei interkvartiliniai periodai (žr. 4 lentelę).

4 lentelė. Chemokinių CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijų medianos įvairiose transplantuoto inksto histologinėse grupėse.

| Chemokinas                  | Norma<br>( $n = 26$ ) | Atmetimas<br>( $n = 44$ ) | Kita histologija<br>( $n = 47$ ) | p          |
|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|
| CXCL9/kre<br>ng/mmol [IKP]  | 0,00<br>[0,00–0,89]   | 5,55<br>[1,04–15,88]      | 1,83<br>[0,00–9,54]              | $p < 0,05$ |
| CXCL10/kre<br>ng/mmol [IKP] | 0,18<br>[0,00–0,37]   | 1,89<br>[0,57–5,89]       | 0,64<br>[0,22–1,47]              | $p < 0,05$ |

CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracija buvo statistiškai reikšmingai didesnė atmetimo grupėje, lyginant tiek su normalios histologijos, tiek su kitų histologinių pokyčių grupe ( $p < 0,05$ ) (4 paveikslas).



4 paveikslas. CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijos normalios histologijos, transplantato atmetimo ir kitos histologijos pacientų grupėse.

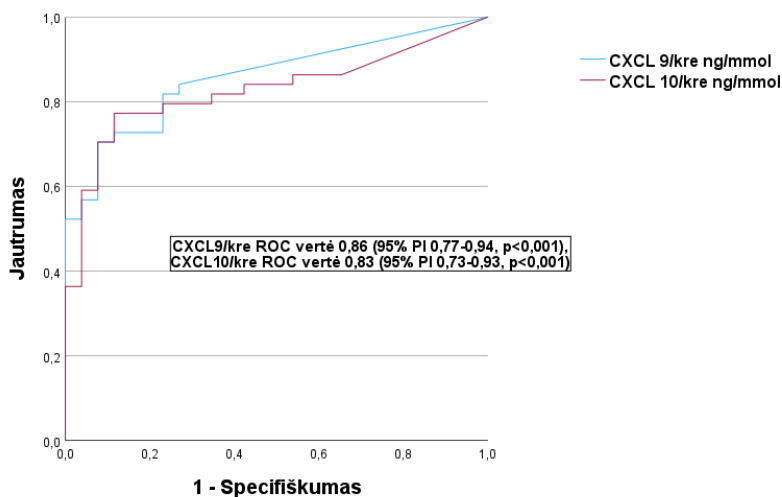
Toliau, pasitelkę ROC analizę, vertinome chemokinių gebėjimą atskirti transplantato atmetimą nuo normalios histologijos (5 paveikslas). CXCL9/kre ploto po kreive ROC vertė buvo 0,86 (95 % PI 0,77–0,94,  $p < 0,001$ ). Iš

kreivės pagal Youden indeksą nustatyta geriausio jautrumo (70,5 %) ir specifiškumo (92,3 %) slenkstinė reikšmė 2,45 ng/mmol. Toliau vertinome CXCL9/kre gebėjimą atskirti atmetimą nuo visų kitų histologinių grupių (tiek normalios histologijos, tiek kitų histologinių pakitimų atvejų): gauta ploto po kreive ROC vertė 0,73 (95 % PI 0,63–0,82,  $p < 0,001$ ), o pagal Youden indeksą parinkta geriausio jautrumo (76,9 %) ir specifiškumo (73,1 %) CXCL9/kre koncentracijos slenkstinė reikšmė buvo 0,11 ng/mmol (5 lentelė).

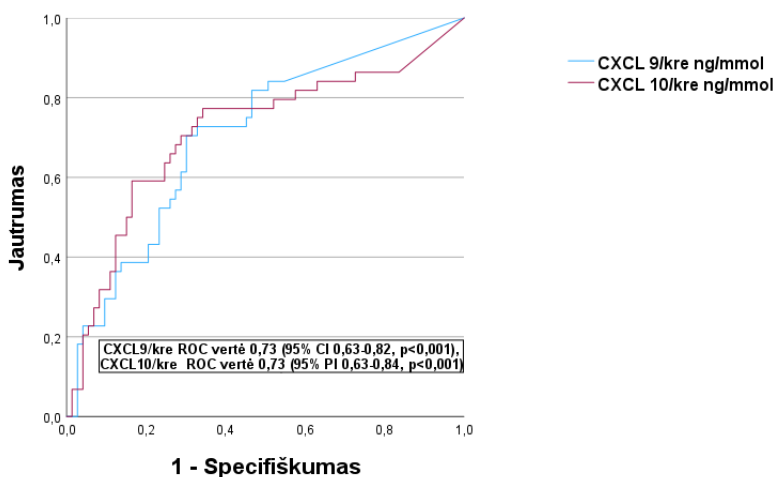
Taip pat analizavome CXCL10/kre gebėjimą atskirti atmetimą nuo normalios histologijos ir atmetimą nuo visų kitų histologinių grupių (6 paveikslas). Pirmuoju atveju nustatyta ploto po kreive ROC vertė buvo 0,83 (95 % PI 0,73–0,93,  $p < 0,001$ ) – kiek mažesnė, palyginti su CXCL9/kre. Geriausio jautrumo (75,6 %) ir specifiškumo (88,5 %) slenkstinė reikšmė buvo 0,65 ng/mmol. Vertinant CXCL10/kre gebėjimą atskirti atmetimą nuo kitų histologinių grupių, gauta ploto po kreive ROC vertė 0,73 (95 % PI 0,63–0,84,  $p < 0,001$ ) – tokia pati, kaip ir CXCL9/kre atveju. Geriausio jautrumo (71,4 %) ir specifiškumo (84,6 %) CXCL10/kre koncentracijos slenkstinė reikšmė buvo 0,42 ng/mmol.

5 lentelė. Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 diskriminacinės savybės, atskiriant pacientus, kuriems yra histologiškai patvirtintas transplantato atmetimas, nuo tų pacientų, kurių transplantato histologija normali, ir visų pacientų, kuriems nėra atmetimo (pacientai, kurių patologija transplantate normali arba kita, ne atmetimo).

|                             | CXCL9/kre        | CXCL10/kre       |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| Atmetimas vs norma          |                  |                  |
| AUC (PI)                    | 0,86 (0,77–0,94) | 0,83 (0,73–0,93) |
| Kritinė vertė, ng/mmol      | 2,45             | 0,65             |
| Jautrumas, %                | 70,5             | 75,6             |
| Specifiškumas, %            | 92,3             | 88,5             |
| Teigiama predikcinė reikšmė | 85,0 %           | 71,7 %           |
| Neigiama predikcinė reikšmė | 66,7 %           | 64,7 %           |
| Atmetimas vs nėra atmetimo  |                  |                  |
| AUC (PI)                    | 0,73 (0,63–0,82) | 0,73 (0,63–0,84) |
| Kritinė vertė, ng/mmol      | 0,11             | 0,42             |
| Jautrumas, %                | 76,9             | 71,4             |
| Specifiškumas, %            | 73,1             | 84,6             |
| Teigiama predikcinė reikšmė | 48,1             | 48,6             |
| Neigiama predikcinė reikšmė | 82,5             | 78,7             |



5 paveikslas. Chemokinių CXCL9/kre ir CXCL10/kre ROC kreivė atskiriant atmetimo histologinius atvejus nuo normos.



6 paveikslas. Chemokinių CXCL9/kre ir CXCL10/kre ROC kreivė atskiriant transplantato atmetimą nuo bet kokių kitų histologinių radinių (normos, grįžtamosios nefropatijos, glomerulosklerozės ir kt.).

Atlikus binarinę logistinę regresiją su logaritminėmis CXCL9/kre reikšmėmis, nustatyta, jog CXCL9/kre 64,9 % tikslumu priskiria pacientą grupei, kur yra atmetimas arba kur jo nėra, ŠS 4,22 (95 % PI 2,03–8,77),  $p < 0,001$ .

Atlikus binarinę logistinę regresiją su logaritminėmis CXCL10/kre reikšmėmis, nustatyta, jog CXCL10/kre 61,7 % tikslumu priskiria pacientą

grupe, kur yra atmetimas arba kur jo nėra, ŠS 7,74 (95 % PI 3,02–19,86),  $p < 0,001$ .

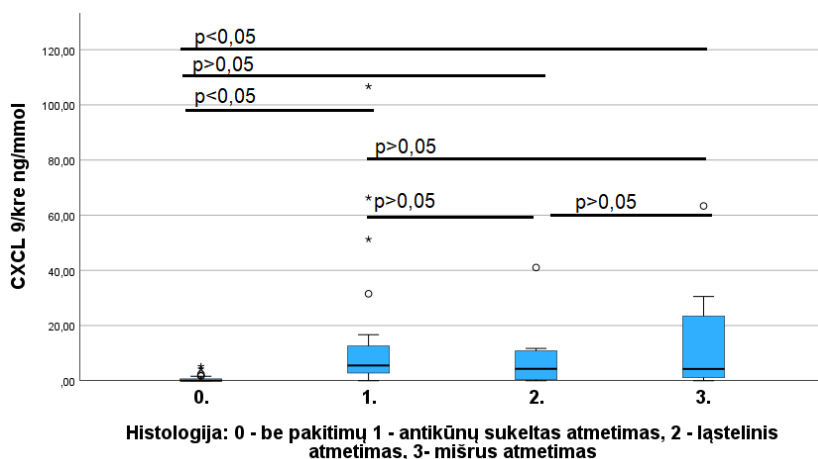
### CXCL9/kre bei CXCL10/kre ir skirtingi transplantato atmetimo tipai

Toliau pagal Banfo klasifikacinius kriterijus atmetimo grupės pacientai suskirstyti į antikūnų sukulto, ląstelinio ir mišraus atmetimo grupes. Chemokinių medianos skirtingų atmetimo tipų grupėse pateiktos 6 lentelėje.

6 lentelė. Chemokinių CXCL9/kre bei CXCL10/kre koncentracijų medianos normos ir įvairių transplantato atmetimo tipų grupėse.

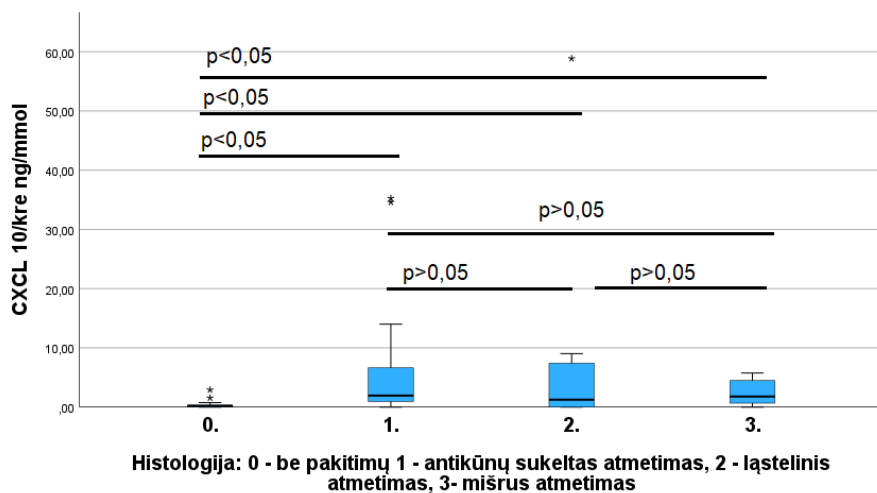
| Chemokinas             | Norma<br>(n = 26),<br>mediana [IKP] | Antikūnų sukeltas<br>atmetimas<br>(n = 25),<br>mediana [IKP] | Ląstelinis<br>atmetimas<br>(n = 9),<br>mediana<br>[IKP] | Mišrus<br>atmetimas<br>(n = 10),<br>mediana<br>[IKP] |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| CXCL9/kre,<br>ng/mmol  | 0,00<br>[0,00–0,89]                 | 5,52<br>[2,65–13,03]                                         | 7,76<br>[0,38–26,36]                                    | 4,26<br>[0,84–25,20]                                 |
| CXCL10/kre,<br>ng/mmol | 0,17<br>[0,00–0,37]                 | 1,95<br>[0,82–6,85]                                          | 1,26<br>[0,00–8,21]                                     | 1,78<br>[0,58–4,49]                                  |

Chemokino CXCL9/kre koncentracijos buvo reikšmingai didesnės antikūnų sukulto ir mišraus atmetimo grupėse, palyginti su normalios histologijos grupe, tačiau ląstelinio atmetimo ir normalios histologijos grupėse statistškai reikšmingo skirtumo negauta (7 paveikslas). Taip pat šio chemokino koncentracija reikšmingai nesiskyrė visų trijų tipų atmetimo grupes lyginant tarpusavyje.



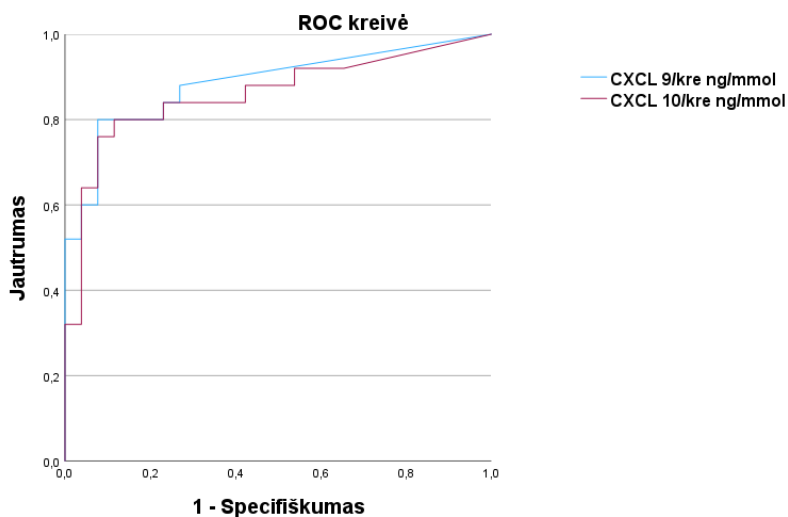
7 paveikslas. CXCL9/kre koncentracijos skirtingų transplantato atmetimų grupėse ir palyginimas su normalios histologijos grupe.

CXCL10/kre koncentracijos buvo statistiškai reikšmingai didesnės lyginant kiekvieną atmetimo grupę su normalios histologijos grupe. Pačias atmetimo grupes lyginant tarpusavyje, CXCL10/kre koncentracijos reikšmingai nesiskyrė (8 paveikslas).



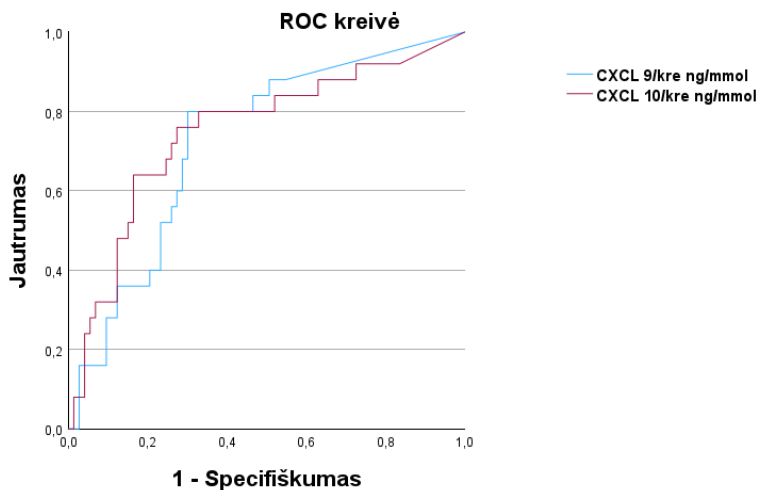
8 paveikslas. CXCL10/kre koncentracijos skirtingų transplantato atmetimų grupėse ir palyginimas su normalios histologijos grupe.

Toliau nagrinėtos chemokinių savybės atskiriant antikūnų sukeltą atmetimą nuo normalios histologijos, todėl iš tolesnės analizės pašalinti ląstelių sukulto ir mišraus atmetimo atvejai. Siekiant atskirti antikūnų sukeltą atmetimą nuo normalios histologijos, apskaičiuota CXCL9/kre ploto po kreive ROC vertė buvo 0,89 (95 % PI 0,79–0,98,  $p < 0,001$ ), CXCL10/kre ROC vertė 0,86 (95 % PI 0,75–0,97,  $p < 0,001$ ) (9 paveikslas).



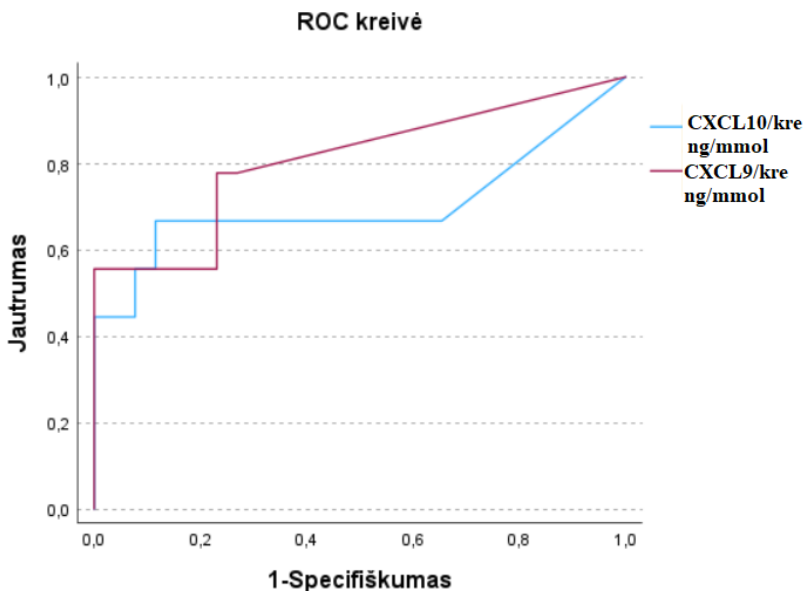
9 paveikslas. CXCL9/kre ir CXCL10/kre ROC kreivės atskiriant normalios histologijos ir antikūnų sukulto atmetimo histologines grupes.

Taip pat apskaičiuotas chemokinių gebėjimas atskirti antikūnų sukeltą atmetimą nuo kitų, su atmetimu nesusijusių histologinių radinių. Gauta CXCL9/kre ROC ploto po kreive reikšmė 0,73 (95 % PI 0,62–0,84,  $p < 0,001$ ), o CXCL10/kre ROC reikšmė 0,75 (95 % PI 0,63–0,87,  $p < 0,001$ ) (10 paveikslas).



10 paveikslas. CXCL9/kre ir CXCL10/kre ROC kreivės atskiriant antikūnų sukeltą atmetimą nuo normos ir kitų histologinių pakitimų (iš analizės pašalinti mišraus ir ląstelinio atmetimo atvejai).

Ląstelinio atmetimo grupę sudarė 9 tiriamieji. Toliau lyginome šiuos atvejus su normalios histologijos grupe. CXCL9/kre ploto po kreive ROC reikšmė buvo 0,81 (95 % PI 0,62–0,99,  $p < 0,01$ ), o CXCL10/kre ploto po kreive ROC reikšmė buvo mažesnė – 0,70 (95 % PI 0,45–0,96,  $p > 0,05$ ) ir nepasižymėjo patikimomis prognostinėmis savybėmis (11 paveikslas).



11 paveikslas. CXCL9/kre ir CXCL10/kre diskriminantinės savybės atskiriant ląstelinio atmetimo grupę nuo normalios histologijos grupės.

Įvertintas ir chemokinių gebėjimas atskirti ląstelinio atmetimo atvejus nuo visų kitų su atmetimu nesusijusių histologinių radinių. CXCL9/kre ir CXCL10/kre ROC ploto po kreive reikšmės buvo atitinkamai 0,67 (95 % PI 0,47–0,86,  $p > 0,05$ ) ir 0,61 (95 % PI 0,35–0,86,  $p > 0,05$ ), taigi nustatytos nepakankamos diskriminantinės chemokinių savybės. Kadangi literatūroje nurodoma, kad poliomos BK viruso nefropatija gali pasireikšti panašiais histologiniais pakitimais kaip ir ląstelinis atmetimas, iš tolesnės analizės pašalinome poliomos BK nefropatijos atvejus [114, 122]. Vis dėlto tai reikšmingai nepagerino ROC ploto po kreive reikšmių: CXCL9/kre ir CXCL10/kre ploto po kreive reikšmės atitinkamai buvo 0,68 (95 % PI 0,48–0,88,  $p > 0,05$ ) ir 0,63 (95 % PI 0,37–0,87,  $p > 0,05$ ).

## **Mažos chemokinių CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijos pacientų grupė**

Tiriamieji atvejai suskirstyti į dvi grupes: mažos CXCL9/kre koncentracijos (kai CXCL9/kre  $< 0,11$  ng/mmol, t. y. ribinė koncentracija, kuri pagal ROC kreivės analizę pasižymi geriausiu jautrumu ir specifiskumu atskiriant atmetimą nuo visų kitų patologijų) ir padidėjusios CXCL9/kre koncentracijos (CXCL9/kre  $\geq 0,11$  ng/mmol). Iš 40 tiriamųjų, kuriems nustatyta maža CXCL9/kre koncentracija, 82,5 % atmetimo nebuvo, tačiau 17,5 % atvejų atmetimas histologiškai buvo rastas: 3 atvejais – antikūnų sukeltas atmetimas, 2 atvejais – ląstelinis atmetimas, 2 atvejais – mišraus tipo atmetimas.

Panašiu principu tiriamieji suskirstyti į dvi grupes pagal CXCL10/kre koncentraciją: kai CXCL10/kre koncentracija  $< 0,42$  ng/mmol, tiriamieji priskirti mažos CXCL10/kre koncentracijos grupei, o kai  $\geq 0,42$  ng/ml – padidėjusios CXCL10/kre koncentracijos grupei. Iš 47 pacientų, kuriems nustatyta maža CXCL10/kre koncentracija, 21,3 % atvejų histologiškai diagnozuotas atmetimas: 5 atvejai antikūnų sukkelto atmetimo, 3 atvejai ląstelinio ir 2 atvejai mišraus atmetimo.

Toliau analizuoti pacientai, kuriems abiejų chemokinių koncentracija buvo maža. Iš 34 tokių pacientų 3 atvejais histologiškai nustatytas antikūnų sukeltas atmetimas, 2 atvejais – ląstelinis, o 1 atveju – mišrus atmetimas. Įvertinus šių atmetimą patyrusių pacientų išeitis, nė vienas iš jų per stebėjimo laikotarpį nebuvo pradėtas dializuoti.

## **Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 padidėjimo atmetimo metu ryšys su laikotarpiu po transplantacijos**

Iškėlėme hipotezę, kad galbūt chemokinių koncentracijos atmetimo metu priklauso nuo laiko po transplantacijos, manydami, jog kuo anksčiau prasideda transplantato atmetimas, tuo imuninė reakcija gali būti audringesnė [123]. Iš visos pacientų grupės atrinkti tik tie pacientai, kuriems histologiškai patvirtintas transplantato atmetimas. Apskaičiuotas Spirmeno koreliacijos koeficientas tarp CXCL9/kre, CXCL10/kre ir laiko (mėn.) nuo transplantacijos iki biopsijos. Gauta nereikšminga neigiama koreliacija tarp CXCL9/kre ir laiko ( $r = -0,220$ ,  $p > 0,05$ ), taip pat CXCL10/kre ir laiko ( $r = -0,271$ ,  $p > 0,05$ ).

Pacientai suskirstyti į dvi grupes: pirmajai priskirti tie, kuriems biopsija atlikta per pirmuosius metus po transplantacijos (tokių buvo 16), o antrajai – visi, kuriems biopsija atlikta vėliau nei per pirmuosius metus po

transplantacijos (tokių buvo 28). Pirmojoje grupėje CXCL9/kre mediana buvo 7,25 [IKP 1,22–34,93], CXCL10/kre mediana 4,63 [IKP 0,18–12,19], o antrojoje grupėje CXCL9/kre mediana 4,99 [IKP 1,04–12,38], CXCL10/kre 1,73 [IKP 0,67–3,14]. Nors matoma tendencija, jog įvykus atmetimui po daugiau nei 12 mėn. nuo transplantacijos chemokinių padidėjimas yra mažesnis nei atmetimo metu pirmaisiais potransplantaciniais metais, tačiau šis skirtumas buvo nereikšmingas ( $p > 0,05$ ).

#### 5.2.2. II uždavinys: CXCL9 ir CXCL10 ryšio su atskirais histologiniais pakitimais pagal Banfo klasifikacinę sistemą analizė

Transplantato biopsijos patologo buvo įvertintos pagal Banfo klasifikacinius kriterijus, kiekvienam histologiniam pokyčiui skirta balų. Siekiant pirmiausia bendrai apžvelgti esamus ryšius tarp histologinių pakitimų ir chemokinių CXCL9/kre bei CXCL10/kre, apskaičiuoti Spirmeno koreliacijos koeficientai ir nubraižytos dendrogramos. Analizei naudotos logaritminės chemokinių reikšmės, į skaičiavimus įtraukti šie histologiniai pakitimai: glomerulitas (g), transplantato glomerulopatija (cg), mezangiumo matriksio išsiplėtimas (mm), tubulitas (t), peritubulinių kapiliarų uždegimas (ptc), intersticiumo uždegimas (i), intersticinė fibrozė (ci), kanalėlių atrofija (ct), intimos arteriitas (v), kraujagyslių fibrozinis intimos sustorėjimas (cv), arteriolų hialinozė (ah) (7 lentelė).

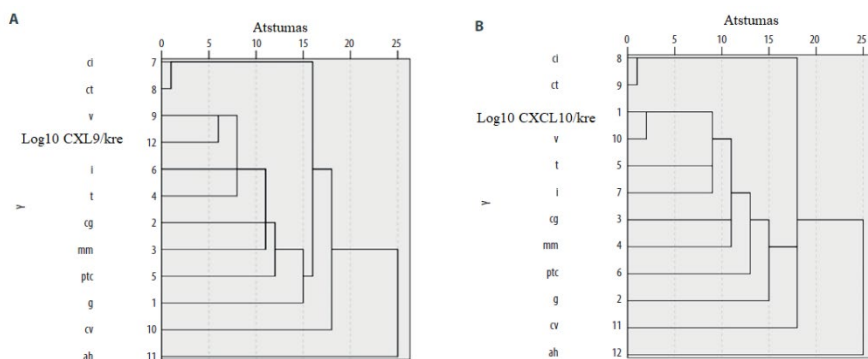
7 lentelė: Spirmeno koreliacijos koeficientai vertinant ryšį tarp chemokinių logaritminių reikšmių ir histologinių pakitimų balų verčių.

|            |   | g           | cg          | mm    | t           | ptc         | i           | ci   | ct   | v           | cv    | ah    |
|------------|---|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------------|------|------|-------------|-------|-------|
| CXCL9/kre  | r | <b>0,24</b> | 0,17        | -0,07 | 0,08        | <b>0,39</b> | <b>0,31</b> | 0,13 | 0,08 | 0,19        | 0,02  | -0,01 |
|            | p | 0,01        | 0,08        | 0,45  | 0,42        | <0,001      | <0,001      | 0,19 | 0,42 | 0,05        | 0,84  | 0,94  |
| CXCL10/kre | r | <b>0,32</b> | <b>0,18</b> | 0,02  | <b>0,24</b> | <b>0,41</b> | <b>0,36</b> | 0,05 | 0,06 | <b>0,22</b> | -0,02 | -0,01 |
|            | p | <0,001      | 0,048       | 0,82  | 0,01        | <0,001      | <0,001      | 0,58 | 0,53 | 0,02        | 0,84  | 0,89  |

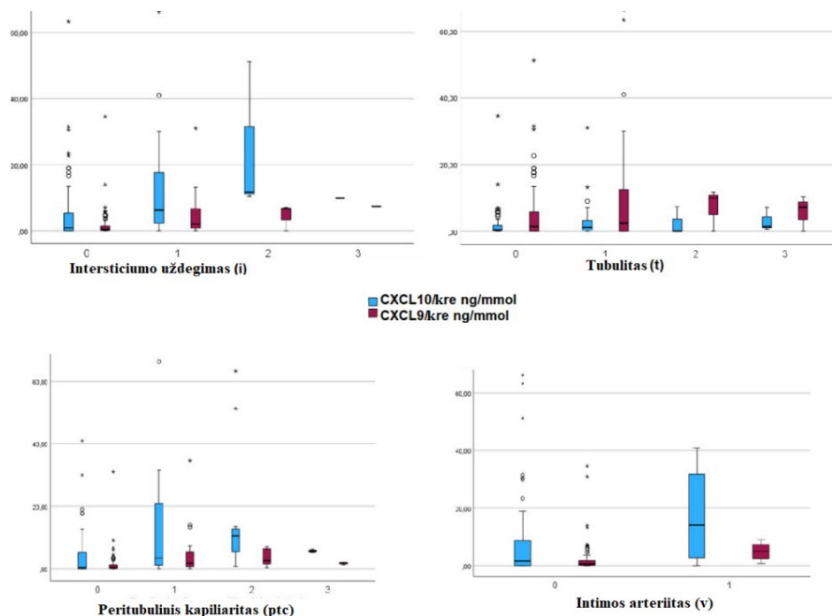
\* glomerulitas (g), transplantato glomerulopatija (cg), mezangiumo matricos išsiplėtimas (mm), tubulitas (t), peritubulinių kapiliarų uždegimas (ptc), intersticiumo uždegimas (i), intersticinė fibrozė (ci), kanalėlių atrofija (ct), intimos arteriitas (v), kraujagyslių fibrozinis intimos sustorėjimas (cv), arteriolių hialinozė (ah).

r – koreliacijos koeficientas; p vertė – reikšmingumo lygmuo.

Iš lentelės matyti, kad tiek su CXCL9/kre, tiek su CXCL10/kre reikšmingai koreliavo balai tokių histologinio vertinimo kriterijų kaip glomerulitas (g), peritubulinių kapiliarų uždegimas (ptc), intersticiumo uždegimas (i). Kiti kriterijai, tokie kaip transplantato glomerulopatija (cg), tubulitas (t) ir arterijų uždegimas (v), koreliavo tik su CXCL10/kre, bet ne su CXCL9/kre reikšmėmis. Hierarchinė klasterinė analizė parodė abiejų chemokinių asociacinę ryšį su tubulitu, intersticiumo uždegimu ir arterijos uždegimu (12 paveikslas).



12 paveikslas. Dendrogramos, rodančios sąsajas tarp chemokinių ir Banfo klasifikacinių kriterijų.



13 paveikslas: CXCL/kre koncentracija skirtingose histologinių pakitimų grupėse. Abiejų chemokinių koncentracija buvo reikšmingai didesnė esant išreikštam i, t ir ptc, tačiau reikšmingai nesiskyrė esant intimos arteriitui (v).

Suskirsčius tiriamuosius į grupes pagal kiekvieno iš Banfo kriterijų balus, nustatyta, kad CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijos buvo reikšmingai didesnės tiems pacientams, kurių biopsijose rastas labiau išreikštas intersticiumo uždegimas ir peritubulinis kapiliaritas (13 paveikslas). Skirstydami pacientus į grupes pagal tubulito balus, priskirtus vertinant histologinį tyrimą, vienai grupei (tų, kuriems tubulitas nenustatytas) priskyrėme t0 įvertintus pacientus, o tuos pacientus, kurių histologiniame tyrime tubulitas vertintas kaip t1, t2 ar t3, priskyrėme antrajai grupei (tų, kuriems tubulitas nustatytas), nes dėl mažo atvejų skaičiaus t2 ir t3 grupėse negalėjome jų vertinti atskirai. Pacientams, kuriems tubulitas nustatytas, abiejų chemokinių koncentracijos buvo didesnės: CXCL9/kre mediana buvo 2,94 ng/mmol [IKP 0,00–11,85 ng/mmol], palyginti su mediana 1,45 ng/mmol [IKP 0,00–6,00 ng/mmol] pacientų, kuriems tubulitas nenustatytas, grupėje,  $p < 0,01$ .

Vidutinė CXCL10/kre koncentracija taip pat buvo didesnė tubulito grupėje (1,26 ng/mmol [IKP 0,17–3,93 ng/mmol]), palyginti su grupe tų, kuriems tubulitas nenustatytas (0,51 ng/mmol [IKP 0,17–1,82 ng/mmol]),  $p < 0,05$ .

Taip pat nustatyta didesnė kiekvieno iš abiejų chemokinių koncentracija pacientams, kuriems nustatytas glomerulitas, arterijų uždegimas, o vien CXCL9/kre koncentracija buvo didesnė pacientams, kuriems rasta išreikšta intersticinė fibrozė, nors visi šie radiniai statistiškai nereikšmingi.

Atlikus vienaveiksnę tiesinę regresinę analizę su chemokinių koncentracijomis ir Banfo kriterijų balais, gauta, jog intersticiumo uždegimas (i), peritubulinis kapiliaritas (ptc) bei kraujagyslių intimos uždegimas (v) buvo reikšmingai susiję su logaritminėmis CXCL9/kre reikšmėmis (8 lentelė). Banfo kriterijų įtaka CXCL9/kre koncentracijai buvo toliau nagrinėjama pasitelkus daugiaveiksnę linijinę regresiją: sukurtame modelyje Banfo kriterijai i, t ir didžiausią įtaką turintis kriterijus v išliko reikšmingi (9 lentelė).

8 lentelė. Banfo histologinių klasifikacinių inksto transplantato kriterijų, lemiančių CXCL9/kre koncentraciją šlapime, vienaveiksnė linijinė regresija.

| Banfo kriterijus | Regresijos koeficientas $\pm$ SP | p vertė |
|------------------|----------------------------------|---------|
| g                | 0,273 $\pm$ 0,117                | 0,145   |
| cg               | 0,022 $\pm$ 0,109                | 0,844   |
| mm               | -0,27 $\pm$ 0,097                | 0,779   |
| t                | -0,121 $\pm$ 0,105               | 0,254   |
| ptc              | 0,183 $\pm$ 0,088                | 0,040*  |
| i                | 0,478 $\pm$ 0,153                | 0,002*  |
| ci               | 0,089 $\pm$ 0,128                | 0,486   |
| ct               | 0,027 $\pm$ 0,148                | 0,854   |
| v                | 0,648 $\pm$ 0,234                | 0,007*  |
| cv               | -0,041 $\pm$ 0,082               | 0,614   |
| ah               | -0,047 $\pm$ 0,072               | 0,510   |

\* Pažymėtos p vertės, kurių reikšmingumo lygmuo  $< 0,05$ .

9 lentelė. Banfo histologinių klasifikacinių inksto transplantato kriterijų, lemiančių CXCL9/kre koncentraciją šlapime, daugiaveiksė linijinė regresija.

| Banfo kriterijus | Regresijos koeficientas $\pm$ SP | p vertė |
|------------------|----------------------------------|---------|
| ptc              | 0,234 $\pm$ 0,079                | 0,004*  |
| i                | 0,362 $\pm$ 0,114                | 0,002*  |
| v                | 0,688 $\pm$ 0,227                | 0,003*  |

Modelio determinacijos koeficientas  $R^2 = 0,231$ . Konstanta 0,300,  $p < 0,001$ .

Toliau nagrinėjant Banfo klasifikacinių histologinių kriterijų įtaką CXCL10/kre koncentracijai šlapime, vienalypė tiesinė regresija parodė, kad reikšmingi buvo i, v ir g kriterijai (10 lentelė). Jie įtraukti į daugialypės tiesinės regresijos modelį ir jame išliko reikšmingi (11 lentelė).

10 lentelė. Banfo histologinių klasifikacinių inksto transplantato kriterijų, lemiančių CXCL10/kre koncentraciją šlapime, vienaveiksė linijinė regresija.

| Banfo kriterijus | Regresijos koeficientas $\pm$ SP | p vertė |
|------------------|----------------------------------|---------|
| g                | 0,234 $\pm$ 0,108                | 0,053   |
| cg               | 0,087 $\pm$ 0,101                | 0,391   |
| mm               | 0,016 $\pm$ 0,090                | 0,860   |
| t                | 0,036 $\pm$ 0,097                | 0,713   |
| ptc              | 0,159 $\pm$ 0,081                | 0,040*  |
| i                | 0,422 $\pm$ 0,141                | 0,004*  |
| ci               | -0,110 $\pm$ 0,118               | 0,355   |
| ct               | 0,110 $\pm$ 0,137                | 0,421   |
| v                | 0,662 $\pm$ 0,216                | 0,003*  |
| cv               | 0,004 $\pm$ 0,075                | 0,960   |
| ah               | -0,043 $\pm$ 0,062               | 0,520   |

\* Pažymėtos p vertės, kurių reikšmingumo lygmuo  $< 0,05$ .

11 lentelė. Banfo histologinių klasifikacinių inksto transplantato kriterijų, lemiančių CXCL10/kre koncentraciją šlapime, daugiaveiksė linijinė regresija.

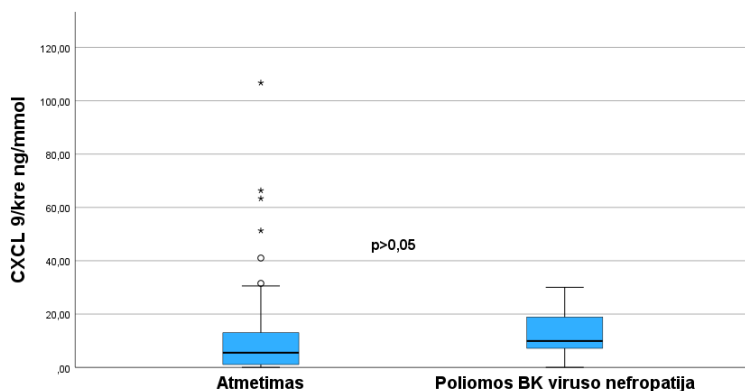
| Banfo kriterijus | Regresijos koeficientas $\pm$ SP | p vertė     |
|------------------|----------------------------------|-------------|
| g                | 0,318 $\pm$ 0,094                | 0,001*      |
| i                | 0,427 $\pm$ 0,104                | $< 0,001$ * |
| v                | 0,318 $\pm$ 0,094                | 0,001*      |

Modelio determinacijos koeficientas  $R^2 = 0,269$ . Konstanta -0,182,  $p < 0,01$ .

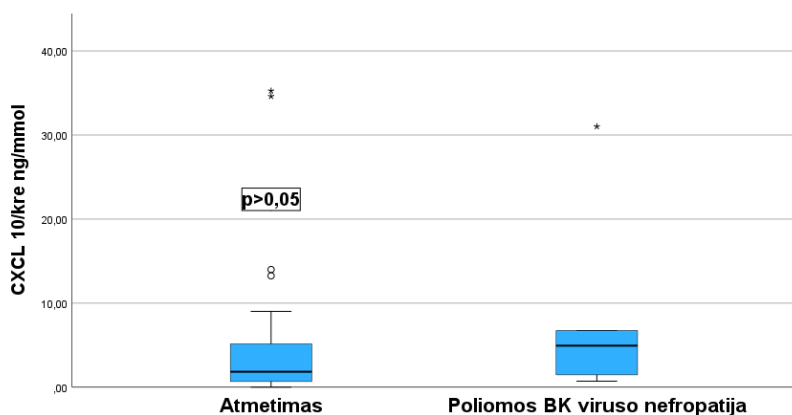
### 5.2.3. III uždavinys: Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 ryšio su kitomis inksto transplantato patologijomis vertinimas

#### Chemokinai ir poliomos BK viruso nefropatija

Iš 117 tiriamųjų 5 (4,3 %) pacientams buvo histologiškai nustatyta poliomos BK viruso nefropatija. CXCL9/kre ir CXCL10/kre medianos atitinkamai buvo 9,91 [IKP 3,58–24,49] ng/mmol ir 4,94 [IKP 1,10–18,88] ng/mmol. Šios koncentracijos buvo reikšmingai didesnės, palyginti su koncentracijomis normalios histologijos grupėse ( $p < 0,05$ ), tačiau reikšmingai nesiskyrė nuo atmetimo grupės chemokinių koncentracijų medianų (14–15 paveikslai).



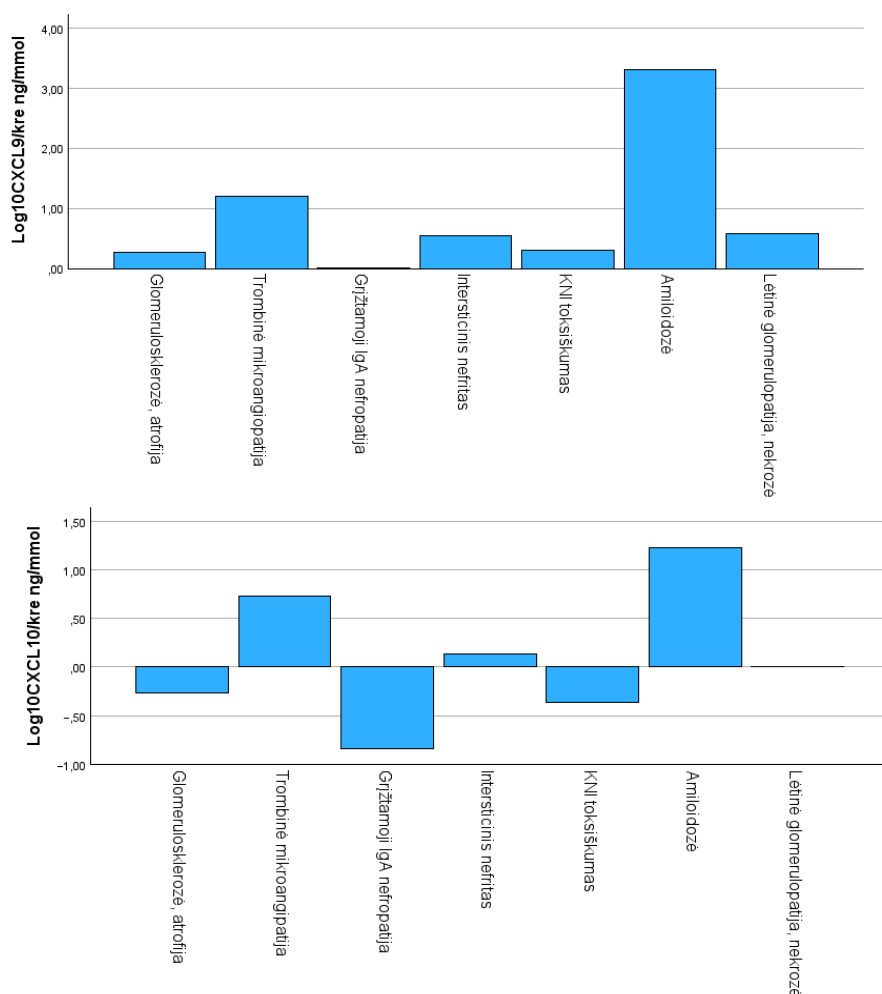
14 paveikslas. CXCL9/kre koncentracijų medianos reikšmingai nesiskyrė atmetimo ir poliomos BK viruso nefropatijos grupėse.



15 paveikslas. CXCL10/kre koncentracijų medianos reikšmingai nesiskyrė atmetimo ir poliomos BK viruso nefropatijos grupėse.

## Chemokina i kitose histologinėse grupėse

Chemokinių koncentracijos šlapime analizuotos pacientams, kuriems histologiškai nustatytos kitos nei atmetimas diagnozės: 17 pacientų nustatyta difuzinė glomerulosklerozė, 3 pacientams – trombinė mikroangiopatija be atmetimo, 3 pacientams rasta IgA nefropatija, 3 – intersticinis nefritas, 8 aptikta kalcineurino inhibitorių toksiškumo požymių, 1 pacientui – AA amiloidozė. Abiejų chemokinių koncentracijos buvo padidėjusios trombinės mikroangiopatijos, amiloidozės atveju, kiek mažiau – intersticinio nefrito atveju, tačiau esant difuzinei glomerulosklerozei, IgA nefropatijai ir kalcineurino inhibitorių toksiškumui, chemokinių koncentracijos buvo mažos (16 paveikslas).



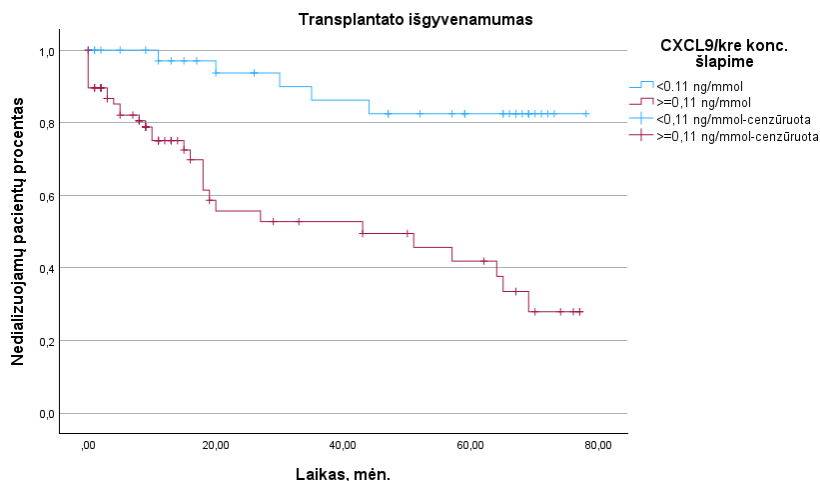
16 paveikslas. Chemokinių koncentracijos šlapime pacientams, kuriems histologiškai nustatyta kita nei atmetimas transplantato patologija. IgA – imunoglobulinas A, KNI – kalcineurino inhibitoriai.

#### 5.2.4. IV uždavinys: Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 ryšys su inksto transplantato prognoze

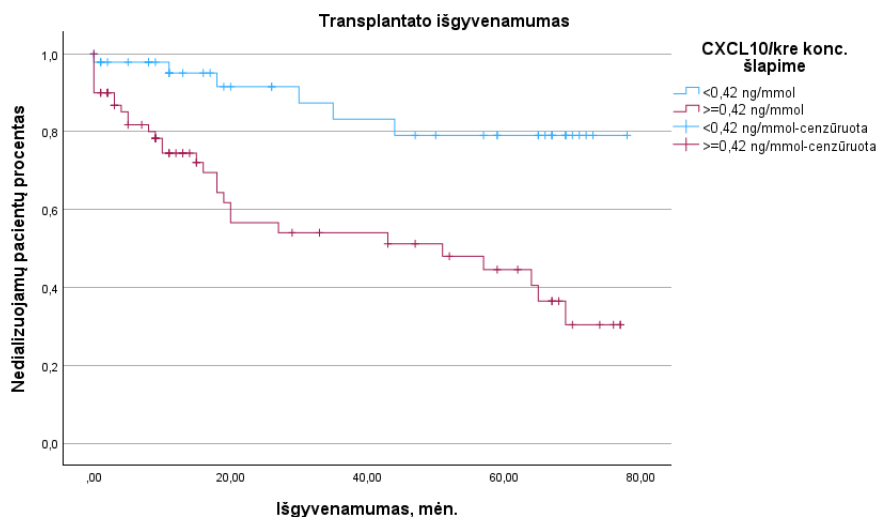
### Chemokinai ir transplantato išgyvenamumas

Toliau nagrinėtas chemokinių ryšys su transplantato išgyvenamumu (laiku nuo biopsijos iki nuolatinės dializės pradėjimo). Atlikta daugialypė Kokso regresinė analizė. Buvo didesnė rizika, kad pacientams, kuriems nustatyta padidėjusi ( $\geq 0,11$  ng/mmol) CXCL9/kre koncentracija, išsivystys galutinės stadijos inksto transplantato nepakankamumas (ŠS 5,16, 95 % PI 1,85–14,42,  $p < 0,01$ ), nepriklausantis nuo paciento amžiaus, lyties, serumo kreatinino koncentracijos biopsijos paėmimo metu ir histologiškai nustatytos atmetimo diagnozės. Iš visų pacientų, kuriems rasta padidėjusi CXCL9/kre koncentracija, 40,3 % per stebėjimo laikotarpį prirėikė pradėti dializę, palyginti su 12,5 % pacientų, kuriems CXCL9/kre buvo maža ( $p < 0,05$ ) (17 paveikslas). Bendra abiejų grupių stebėjimo laikotarpio mediana 15,0 mėn. [IKP 6,0–58,0], mažos CXCL9/kre stebėjimo laikotarpio mediana 49,5 mėn. [IKP 15,5–67,0], padidėjusios CXCL9/kre koncentracijos pacientų stebėjimo mediana 11,0 mėn. [IKP 3,0–23,5].

Didesnė tikimybė, kad reikės pradėti dializę, buvo ir pacientams, kurių CXCL10/kre koncentracija buvo padidėjusi ( $\geq 0,42$  ng/mmol) – šansų santykis 3,25, 95 %PI 1,27–8,36,  $p = 0,01$ . 12,8 % pacientų, kuriems CXCL10/kre koncentracija buvo maža, pradėta dializė, o padidėjusios CXCL10/kre koncentracijos pacientų grupėje tokių buvo 42,9 % ( $p < 0,05$ ) (18 paveikslas).



17 paveikslas. Transplantuoto inksto išgyvenamumas, esant padidėjusiai ir normaliai chemokino CXCL9/kre koncentracijai šlapime.

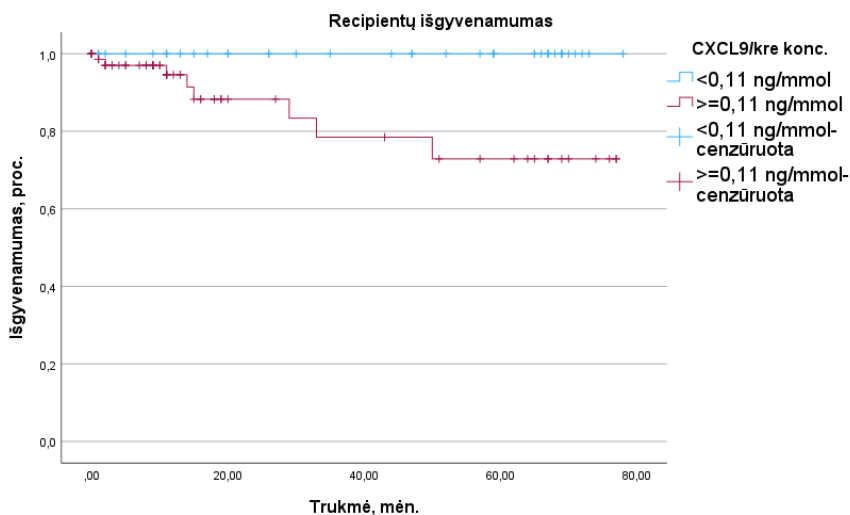


18 paveikslas. Transplantuoto inksto išgyvenamumas, esant padidėjusiai ir normaliai chemokino CXCL10/cre koncentracijai šlapime.

Transplantato išeitys buvo vertintos prėjus 1 m. nuo transplantato biopsijos. Toje pacientų grupėje, kurioje CXCL9/cre koncentracija buvo  $< 0,11$  ng/mmol, po 1 m. funkcionuojančių transplantatų buvo 97 %, o padidėjusios CXCL9/cre koncentracijos grupėje tokių transplantatų buvo tik 66,7 % ( $p < 0,01$ ). Taip pat palygintos išeitys pagal CXCL10/cre koncentraciją. Mažos ( $< 0,42$  ng/mmol) CXCL10/cre koncentracijos pacientų grupėje prėjus 1 m. nuo biopsijos transplantatas funkcionavo 92,7 % recipientų, o padidėjusios CXCL10/cre koncentracijos grupėje tokių buvo tik 69,2 % ( $p < 0,01$ ).

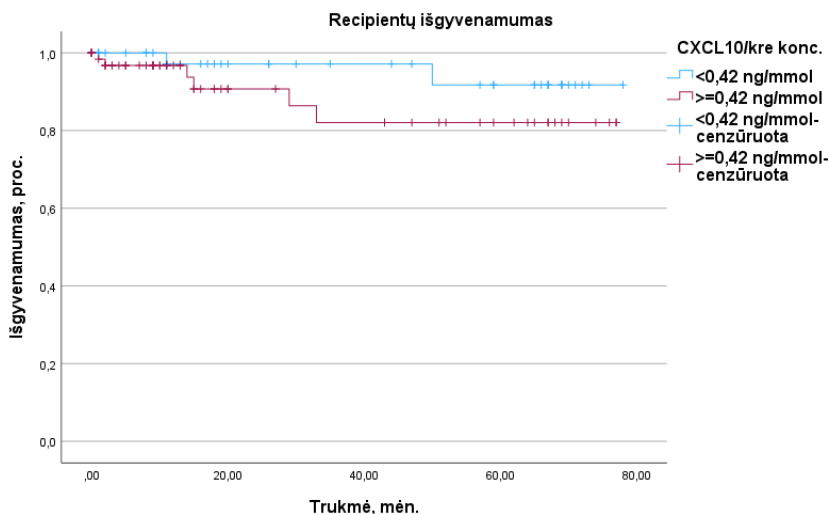
### Chemokinai ir recipientų išgyvenamumas

Toliau analizuota chemokinų reikšmė recipientų išgyvenamumui. Iš tų pacientų, kurių CXCL9/cre koncentracija buvo  $< 0,11$  ng/mmol, nebuvo nė vieno mirties atvejo per visą stebėjimo laikotarpį, o iš pacientų, kurių CXCL9/cre koncentracija buvo padidėjusi (tokių buvo 77), išgyveno 69 (89,6 %) pacientai,  $p < 0,05$ . Išgyvenamumo kreivė pateikta 19 paveiksle



19 paveikslas. Recipientų išgyvenamumas mažos ir padidėjusios CXCL9/kre grupėse.

Iš 47 recipientų, kurių CXCL10/kre koncentracija buvo  $< 0,42$  ng/mmol, išgyveno 45 (95,8 %) pacientai, o iš 70 recipientų, kurių CXCL10/kre buvo didesnė, išgyveno 91,4 % pacientų. Vidutinė išgyvenamumo trukmė mažos ir didelės CXCL10/kre grupėse buvo atitinkamai 74,6 ir 66,8 mėn., tačiau reikšmingai nesiskyrė ( $p > 0,05$ ). Išgyvenamumo kreivė pateikta 20 paveiksle.



20 paveikslas. Recipientų išgyvenamumas mažos ir didelės CXCL10/kre koncentracijos pacientų grupėse.

5.1.5. V uždavinys. Išvestinių bendro kraujo tyrimo indeksų ryšys su chemokinais CXCL9 bei CXCL10 ir transplantato atmetimu bei prognoze

Šiame darbe naudojome tik tuos endobiogenikos metodo indeksus, kuriuos galima apskaičiuoti pagal bendro kraujo tyrimo rodiklius, todėl toliau juos vadinsime išvestiniais bendro kraujo tyrimo rodiklių indeksais (iBKTI). 12 lentelėje pateiktos indeksų formulės, normos reikšmės bendrojoje populiacijoje ir gautos indeksų medianos tiriamojoje populiacijoje.

12 lentelė. iBKTI indeksai, jų normos reikšmės ir mediana bei IKP tirtoje populiacijoje.

| Indekso pavadinimas                           | Formulė                                                  | Normos reikšmės                                | Indekso mediana [IKP] tiriamojoje populiacijoje |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Katabolizmo ir anabolizmo indeksas            | GTS indeksas / (GS indeksas $\times$ Starterio indeksas) | 1,80–3,0                                       | 4,99 [2,92–8,00]                                |
| Adaptacijos indeksas                          | Eos / Mon                                                | 0,25–0,50                                      | 0,11 [0,07–0,21]                                |
| Antinksčių žievės indeksas                    | GTS indeksas / (GS indeksas) <sup>2</sup>                | 2,70–3,30                                      | 7,61 [4,01–16,37]                               |
| Kortizolio indeksas                           | Katabolizmo-anabolizmo indeksas / adaptacijos indeksas   | 3,0–7,0                                        | 37,42 [16,42–111,53]                            |
| Genitalinio santykio (GS) indeksas            | Ery / (Leu $\times$ 10e3)                                | moterims:<br>0,70-0,85<br>vyrams:<br>0,80-0,95 | 0,63 [0,45–0,76]                                |
| Koreguotas genitalinio santykio (GS) indeksas | GS indeksas $\times$ Starterio indeksas                  | moterims:<br>0,70-0,85<br>vyrams:<br>0,85–1,05 | 0,58 [0,30–0,86]                                |
| Leukocitų mobilizacijos indeksas (LMI)        | (Plt $\times$ Neu $\times$ HgB)/(30000 $\times$ Leu)     | 0,85–1,15                                      | 0,76 [0,60–0,92]                                |
| Trombocitų mobilizacijos indeksas (TMI)       | Plt/(60 $\times$ Ery)                                    | 0,85–1,15                                      | 0,85 [0,66–1,11]                                |
| Starterio indeksas                            | LMI/TMI                                                  | 0,85–1,15                                      | 0,90 [0,67–1,18]                                |
| Genitotirodinio santykio (GTS) indeksas       | Neu / Limf                                               | 1,50–2,50                                      | 3,07 [2,19–4,21]                                |
| TRH reaktyvacijos indeksas                    | Mon / Limf                                               | 0,05–0,25                                      | 0,44 [0,29–0,59]                                |

Eos — eozinofilai (%); Limf — limfocitai (%); Mon — monocitai (%); Neu — neutrofilai (%); Plt — trombocitai (vnt/mm<sup>3</sup>—pvz., 185 000); Ery — eritrocitai (tūkstančiai/mm<sup>3</sup>—pvz., 4400); Leu — leukocitai (vnt/mm<sup>3</sup>—pvz., 6100); HgB — hemoglobinas (g/dl). IKP – interkvartinilis periodas.

Pirmiausia įvertinome, kokios iBKTi reikšmės („padidėjusios“, „sumažėjusios“ ar atitinkančios bendros populiacijos normos ribas) vyraavo visoje tiriamojoje populiacijoje (13 lentelė).

13 lentelė. iBKTi reikšmės visoje tiriamojoje populiacijoje.

| Indeksas                  | % pacientų, kurių indekso reikšmė sumažėjusi | % pacientų, kurių indekso reikšmė normali | % pacientų, kurių indekso reikšmė padidėjusi |
|---------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Adaptacijos               | 76,9                                         | 12,0                                      | 11,1                                         |
| LMI                       | 59,8                                         | 32,5                                      | 7,7                                          |
| TMI                       | 47,9                                         | 34,2                                      | 17,9                                         |
| Starterio                 | 42,7                                         | 30,8                                      | 26,5                                         |
| Katabolizmo ir anabolizmo | 6,8                                          | 23,9                                      | 69,2                                         |
| GTS santykio              | 10,3                                         | 30,8                                      | 59,0                                         |
| GS                        | 76,1                                         | 16,2                                      | 7,7                                          |
| Koreguoto GS              | 70,1                                         | 17,1                                      | 12,8                                         |
| Antinksčių žievės         | 12,0                                         | 12,8                                      | 75,2                                         |
| Kortizolio                | 2,6                                          | 14,5                                      | 82,9                                         |
| TRH reaktyvacijos         | 1,7                                          | 15,4                                      | 82,9                                         |

Kadangi tiriamąją 117 inksto recipientų grupę sudarė gana heterogeniški pacientai, tiek turintys transplantato veiklos sutrikimų, gretutinių ligų, tiek sąlyginai sveiki, kurių transplantato funkcija normali, pacientai, atskirai nagrinėjome sąlyginai sveikų recipientų grupę, kurią sudarė pacientai, kuriems transplantato histologinis tyrimas nerodė jokios patologijos. Vis dėlto net ir šioje grupėje tik mažiau nei 40 % recipientų LMI, PMI, GTS indekso reikšmės atitiko normą (14 lentelė). Kortizolio, antinksčių žievės indeksai daugiau nei 80 % pacientų buvo padidėję. Adaptacijos indeksas daugiau nei 95 % pacientų buvo sumažėjęs, nė vienam pacientui jis neatitiko normos. Padidėjęs TRH reaktyvacijos indeksas nustatytas > 92 % pacientų. GS ir koreguoto GS indeksų reikšmės didesniajai daliai pacientų buvo sumažėjusios.

14 lentelė. iBKTI reikšmės apskaičiuotos tik tiems pacientams, kurių transplantato histologinis tyrimas buvo be patologijos. Lentelėje pateikiamas procentas pacientų, kurių indekso vertė buvo mažesnė arba didesnė nei pagal bendrąją populiaciją nustatyta norma arba jai lygi.

| Indeksas                 | % pacientų, kurių indekso reikšmė sumažėjusi | % pacientų, kurių indekso reikšmė normali | % pacientų, kurių indekso reikšmė padidėjusi |
|--------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Adaptacijos              | 96,2                                         | 0                                         | 3,8                                          |
| LMI                      | 65,4                                         | 30,8                                      | 3,8                                          |
| TMI                      | 50,0                                         | 38,5                                      | 11,5                                         |
| Starterio                | 38,5                                         | 26,9                                      | 34,6                                         |
| Katablizmo ir anabolizmo | 11,5                                         | 19,2                                      | 69,2                                         |
| GTS                      | 15,4                                         | 34,6                                      | 50,0                                         |
| GS                       | 84,6                                         | 7,7                                       | 7,7                                          |
| Koreguoto GS             | 73,1                                         | 15,4                                      | 11,5                                         |
| Antinksčių žievės        | 11,5                                         | 3,8                                       | 84,6                                         |
| Kortizolio               | 3,8                                          | 7,7                                       | 88,5                                         |
| TRH reaktyvacijos        | 0                                            | 7,7                                       | 92,3                                         |

LMI – leukocitų mobilizacijos indeksas; TMI – trombocitų mobilizacijos indeksas.

### Indeksų ryšys su chemokinais

Pirmiausia atlikta koreliacijų analizė siekiant įvertinti ryšį tarp iBKTI ir chemokinių. Apskaičiuotas Spirmeno koreliacijos koeficientas, rezultatai pateikti 15 lentelėje. Nustatyta tiesioginė silpna koreliacija tarp adaptacijos indekso, genitotiroidinio indekso ir CXCL9/kre bei CXCL10/kre.

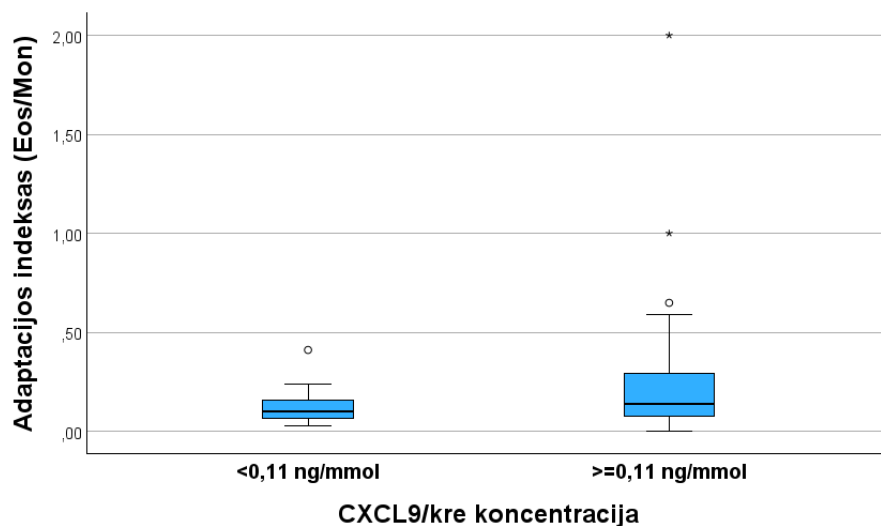
15 lentelė. CXCL9/kre bei CXCL10/kre koreliacijos su iBKTI reikšmėmis. Statistiškai reikšmingos koreliacijos pažymėtos \*, kai  $p < 0,05$ , ir \*\*, kai  $p < 0,01$ .

| Indeksas                           | CXCL9/kre | CXCL10/kre |
|------------------------------------|-----------|------------|
| Katabolizmo ir anabolizmo indeksas | 0,175     | 0,097      |
| Adaptacijos indeksas               | 0,202*    | 0,318**    |
| Antinksčių žievės indeksas         | 0,083     | 0,061      |
| Kortizolio indeksas                | –0,053    | –0,150     |
| GS indeksas                        | 0,059     | 0,113      |
| Koreguotas GS indeksas             | 0,020     | 0,097      |
| LMI                                | 0,08      | 0,079      |
| TMI                                | 0,061     | –0,068     |
| Starterio indeksas                 | –0,020    | 0,077      |
| GTS indeksas                       | 0,316**   | 0,231*     |
| TRH reaktyvacijos indeksas         | 0,183     | 0,171      |

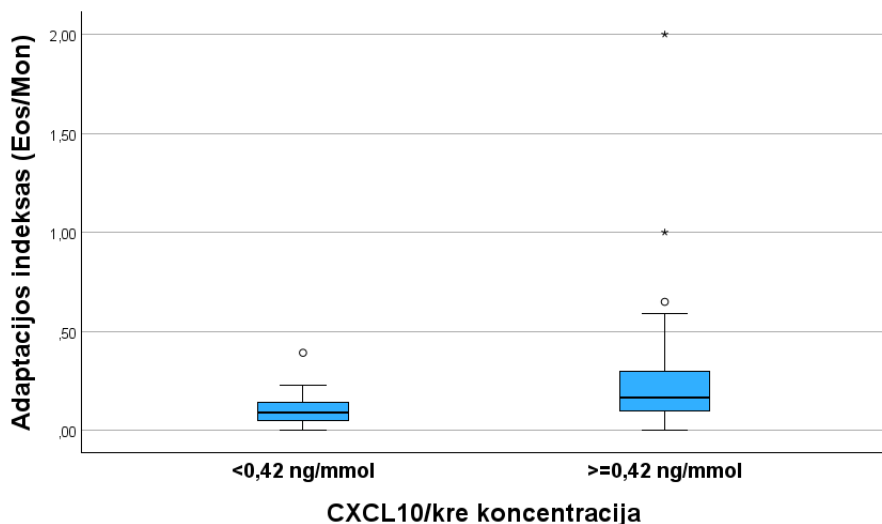
Toliau apskaičiuotos CXCL/kre medianos padidėjusio, normalaus ir sumažėjusio adaptacijos indekso ir genitotiroidinio santykio indekso grupėse (16 lentelė, 21–22 paveikslai).

16 lentelė. Indeksų reikšmių medianos esant normaliai arba padidėjusiai chemokinių koncentracijai šlapime. Adaptacijos indekso reikšmės buvo padidėjusios esant didesnei CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijai.

| Chemokinas | Chemokino reikšmė | Adaptacijos indeksas mediana [IKP] | P reikšmė | Genitotiroidinio santykio indeksas mediana [IKP] | P reikšmė |
|------------|-------------------|------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------|-----------|
| CXCL9/kre  | Normalus          | 0,1 [0,06–0,16]                    | 0,008     | 2,69 [1,89–3,73]                                 | 0,134     |
|            | Padidėjęs         | 0,14 [0,08–0,29]                   |           | 3,19 [2,25–4,55]                                 |           |
| CXCL10/kre | Normalus          | 0,09 [0,05–0,14]                   | 0,003     | 2,76 [2,02–3,68]                                 | 0,538     |
|            | Padidėjęs         | 0,16 [0,09–0,31]                   |           | 3,19 [2,23–5,34]                                 |           |



21 paveikslas. Adaptacijos indekso reikšmės esant padidėjusiai ir normaliai CXCL9/kre koncentracijai. Eos – eozinofilai; Mon – monocitai.



22 paveikslas. Adaptacijos indekso reikšmės esant padidėjusiai ir normaliai CXCL10/kre koncentracijai. Eos – eozinofilai; Mon – monocitai.

### Indeksai ir transplantuoto inksto atmetimas

Pacientai buvo suskirstyti į dvi grupes pagal transplantato histologinio tyrimo atsakymą: transplantato atmetimo grupę ( $n = 41$ ) ir pacientų be atmetimo grupę ( $n = 70$ ). Palygintos šių dviejų grupių pacientų iBKTI reikšmės, statistiniai skaičiavimai atlikti naudojant Mano ir Vitnio testą. Atmetimo grupėje nustatytos reikšmingai didesnės adaptacijos indekso reikšmės ir reikšmingai mažesnis kortizolio ir antinksčių žievės indeksų santykis, nors patys kortizolio ir antinksčių žievės indeksai reikšmingai nesiskyrė (17 lentelė). Analogiški rezultatai buvo gauti lyginant atmetimo grupę su normalios (be kitų galimų transplantato patologijų) histologijos grupe.

17 lentelė. iBKTI reikšmės pacientams, kuriems nustatytas transplantato atmetimas ir kuriems atmetimo nėra.

| Rodiklis                                             | Atmetimo grupė<br>(mediana [IKP]) | Grupė be atmetimo,<br>(mediana [IKP]) | <i>p</i> reikšmė |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------|
| Amžius, m.                                           | 46,0 [36,0–58,0]                  | 46,0 [31,0–55,5]                      | 0,585            |
| KMI, kg/m <sup>2</sup>                               | 24,6 [21,6–29,0]                  | 23,3 [20,7–27,9]                      | 0,117            |
| Imunosupresijos<br>stažas, m.                        | 6,0 [1,0–11,0]                    | 3,0 [0,75–11,0]                       | 0,330            |
| Kreatinino konc.<br>( $\mu$ mol/l) biopsijos<br>metu | 216,0 [150,3–371,5]               | 165,5 [119,5–318,5]                   | 0,055            |

| Rodiklis                                                     | Atmetimo grupė<br>(mediana [IKP]) | Grupė be atmetimo,<br>(mediana [IKP]) | p reikšmė |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------|
| Kreatinino konc.<br>(μmol/l) praėjus 3<br>mėn. nuo biopsijos | 187,0 [137,0–388,0]               | 137,0 [105,0–219,5]                   | 0,031*    |
| Takrolimo konc.,<br>ng/ml                                    | 4,9 [4,0–10,3]                    | 5,8 [4,3–7,2]                         | 0,797     |
| Leukocitų konc.,<br>10e9/l                                   | 6,4 [5,1–8,7]                     | 6,8 [5,6–8,4]                         | 0,634     |
| Neutrofilų proc.                                             | 65,8 [60,0–72,4]                  | 66,0 [58,7–71,3]                      | 0,545     |
| Limfocitų proc.                                              | 21,6 [17,7–27,5]                  | 21,2 [16,2–28,4]                      | 0,876     |
| Monocitų proc.                                               | 8,2 [7,0–10,8]                    | 9,5 [8,0–11,4]                        | 0,046*    |
| Mofetilio mikofenolato<br>dozė, g                            | 1,5 [1,0–2,0]                     | 2,0 [1,4–2,0]                         | 0,166     |
| <b>iBKTI</b>                                                 |                                   |                                       |           |
| Adaptacijos                                                  | 0,15 [0,09–0,43]                  | 0,10 [0,05–0,18]                      | 0,009**   |
| LMI                                                          | 0,80<br>[0,61–0,96]               | 0,71 [0,58–0,90]                      | 0,172     |
| TMI                                                          | 0,79<br>[0,64–1,09]               | 0,87 [0,66–1,12]                      | 0,621     |
| Starterio                                                    | 0,98<br>[0,70–1,27]               | 0,87 [0,64–1,15]                      | 0,236     |
| Katabolizmo ir<br>anabolizmo                                 | 4,5<br>[2,91–8,29]                | 5,02 [3,01–8,01]                      | 0,779     |
| GTS                                                          | 2,98 [2,23–4,06]                  | 0,62 [0,44–0,72]                      | 0,908     |
| Kortizolio                                                   | 29,54 [10,21–87,94]               | 47,39 [18,50–126,40]                  | 0,157     |
| GS                                                           | 0,67 [0,45–0,80]                  | 0,62 [0,44–0,72]                      | 0,460     |
| Antinksčių žievės                                            | 6,67 [3,27–17,61]                 | 8,21 [4,30–16,65]                     | 0,467     |
| Koreguoto GS                                                 | 0,69 [0,31–0,97]                  | 0,53 [0,30–0,82]                      | 0,258     |
| Kortizolio ir<br>antinksčių žievės<br>santykio               | 3,77 [1,86–6,66]                  | 5,71 [3,41–9,40]                      | 0,013*    |
| TRH reaktyvacijos                                            | 0,41 [0,28–0,56]                  | 0,47 [0,30–0,65]                      | 0,259     |

### Kortizolio ir antinksčių žievės indekso santykis

Kortizolio indeksą rekomenduojama interpretuoti atsižvelgiant į antinksčių žievės indeksą: paprastai skaičiuojamas šių indeksų santykis, kurio reikšmė turėtų būti apie 3 [124]. Tiriamiesiems buvo apskaičiuotas šių indeksų santykis – pasirodė, kad tik 22 (18,8 %) pacientų jis buvo apytiksliai lygus 3 (nuo 2,5 iki 3,4). Toliau nagrinėjant tik šiuos 22 pacientus nustatyta, kad 9,1 % iš jų histologinis transplantato tyrimas buvo be pakitimų, 31,8 % nustatytas transplantato atmetimas, o 59,1 % pacientų buvo nustatyta kitų nei atmetimas pakitimų inksto biopsijoje.

Lyginant pacientus, kurių kortizolio ir antinksčių žievės indekso santykis buvo padidėjęs, su tais, kurių santykis sumažėjęs, pastebėta, kad didesnio santykio grupėje transplantato atmetimo atvejų buvo mažiau, palyginti su sumažėjusio santykio pacientais, atitinkamai 31,9 % ir 60,9 % ( $p < 0,05$ ).

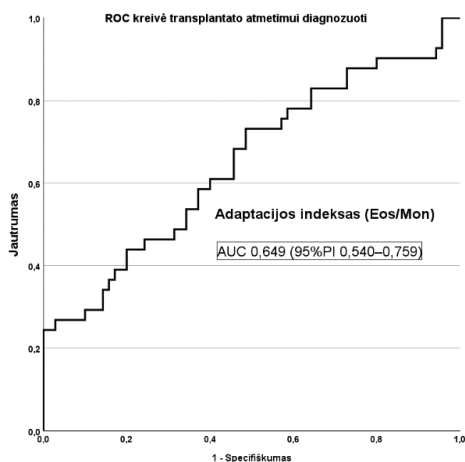
Vis dėlto kortizolio ir antinksčių žievės indeksų santykio plotas po kreive diferencijuojant transplantato atmetimą buvo tik 0,356 (PI 0,246–0,467).

Kadangi vartojama imunosupresija, ypač kortikosteroidai, gali turėti įtakos indeksų reikšmėms, palyginome pacientų, kuriems yra didelis ir kuriems mažas kortizolio ir antinksčių žievės indeksų santykis, grupes: padidėjusio santykio grupėje 90 % pacientų vartojo metilprednizoloną, dozės mediana buvo 6 mg, o sumažėjusio santykio grupėje 91 % pacientų vartojo metilprednizoloną, dozės mediana buvo didesnė – 8 mg.

### Adaptacijos indeksas ir transplantato atmetimas

Daugiau nei dviem trečdaliams inksto transplantato recipientų buvo nustatytos sumažėjusios adaptacijos indekso reikšmės, lyginant su pagal bendrąją populiaciją priimtomis normomis. Adaptacijos indekso plotas po kreive diferencijuojant atmetimą nuo kitos histologijos buvo 0,649 (95 % PI 0,540–0,759) (žr. 23 paveikslą).

Visgi įdomu tai, kad pacientams, kurių histologiniame transplantato tyrime nustatytas atmetimas, šio indekso reikšmės buvo kur kas didesnės nei pacientams be atmetimo, nors vertinant pagal bendrosios populiacijos normas, reikšmės atitiko sumažėjusias arba normalias vertes.



23 paveikslas. Adaptacijos indekso (Eos/Mon) gebėjimas atskirti pacientus, kuriems yra histologiškai patvirtintas transplantato atmetimas, nuo visų kitų bioptuotų transplantato recipientų.

Iš 14 pacientų, kurių adaptacijos indekso reikšmė atitiko bendros populiacijos normos ribas, 78,6 % histologiniame tyrime nustatytas transplantato atmetimas, likusiems 21,4 % rasta kita, su atmetimu nesusijusi transplantato patologija.

Iš tų pacientų (n = 13), kurių adaptacijos indekso reikšmės buvo padidėjusios vertinant pagal bendrosios populiacijos normos vertes, 7,7 % atvejų histologinis transplantato tyrimas buvo be patologijos, 30,8 % histologiškai nustatytas transplantato atmetimas, o 61,5 % rasta kita, su atmetimu nesusijusi transplantato patologija.

### **iBKTi ir transplantato išgyvenamumas**

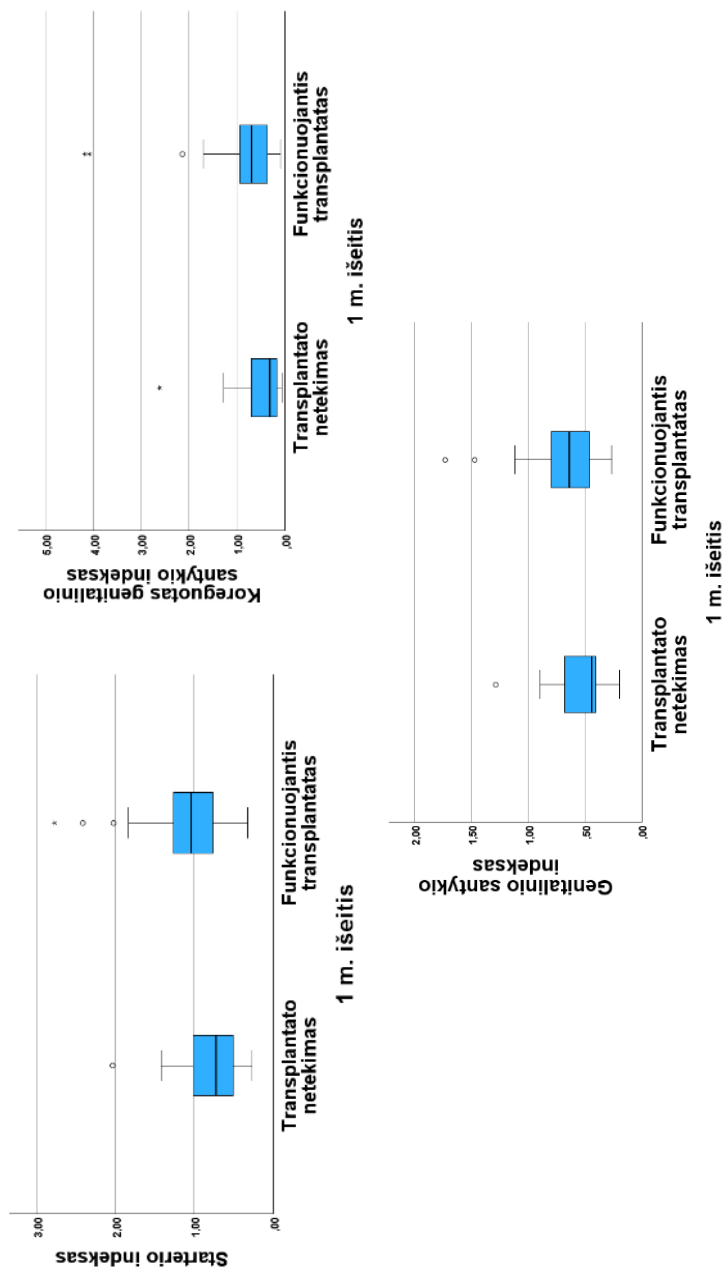
Tiriamieji buvo suskirstyti į dvi grupes pagal vienerių metų transplantato išgyvenamumą: pirmąją grupę sudarė pacientai, kurių transplantatas nustojo funkcionuoti per pirmuosius metus nuo transplantato biopsijos, tokių pacientų buvo 18. Antrąją grupę sudarė pacientai, kurių transplantatas išgyveno > 1 m. Tada palygintos šių dviejų grupių pacientų indeksų medianos ir kiti klinikiniai parametrai. Rezultatai pateikti 18 lentelėje. Pastebėta, jog mažesnio transplantato išgyvenamumo grupėje buvo mažesnės GS, starterio bei koreguoto GS indekso reikšmės, tačiau nei vieno indekso medianos tarp grupių reikšmingai nesiskyrė (24 paveikslas).

18 lentelė. Per 1 metus nuo biopsijos prarasto transplantato grupės ir veikiančio transplantato grupės klinikinė charakteristika.

| <b>Klinikiniai duomenys</b>                             | <b>Prarasto transplantato grupė (mediana [IKP])</b> | <b>Veikiančio transplantato grupė (mediana [IKP])</b> | <b>P reikšmė</b> |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|
| Paciento amžius                                         | 31,50 [28,00–56,50]                                 | 43,50 [31,2–53,75]                                    | 0,222            |
| KMI                                                     | 21,92 [20,62–26,00]                                 | 24,62 [20,82–28,69]                                   | 0,431            |
| GFG biopsijos metu                                      | 24,00 [15,00–36,00]                                 | 41,00 [26,00–56,50]                                   | 0,109            |
| Kreatinino konc. biopsijos metu                         | 430,00 [294,50–472,50]                              | 155,00 [121,00–231,00]                                | < 0,001*         |
| Kreatinino konc. serume po 1 mėn.                       | 235,73 [148,00–314,00]                              | 216,18 [110,75–247,50]                                | 0,042*           |
| Kreatinino konc. serume po 3 mėn.                       | 323,50 [221,25–386,25]                              | 128,00 [108,00–175,00]                                | 0,043*           |
| Kreatinino konc. serume po 6 mėn.                       | 385,50 [313,5–506,5]                                | 153,00 [108,50–218,00]                                | 0,023*           |
| Laikas nuo transplantacijos iki inksto biopsijos (mėn.) | 48,50 [11,50–107,5]                                 | 16,00 [8,00–73,50]                                    | 0,161            |
| CRB                                                     | 1,03 [0,29–8,25]                                    | 1,70 [0,90–3,77]                                      | 0,932            |

| <b>Klinikiniai duomenys</b>    | <b>Prarasto transplantato grupė (mediana [IKP])</b> | <b>Veikiančio transplantato grupė (mediana [IKP])</b> | <b>P reikšmė</b> |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|
| Takrolimo konc., ng/ml         | 5,00 [3,68–7,68]                                    | 5,90 [4,00–7,70]                                      | 0,780            |
| Mofetilio mikofenolato dozė, g | 1,5 [1,0–2,0]                                       | 2,0 [1,4–2,0]                                         | 0,166            |
| Kortikosteroidų dozė, mg       | 8,00 [4,00–9,00]                                    | 4,00 [4,00–8,00]                                      | 0,119            |
| <b>iBKTI</b>                   |                                                     |                                                       |                  |
| Adaptacijos                    | 0,11 [0,04–0,28]                                    | 0,12 [0,07–0,20]                                      | 0,838            |
| Katabolizmo ir anabolizmo      | 6,98 [3,08–19,96]                                   | 4,80 [2,57–6,78]                                      | 0,735            |
| GTS                            | 3,94 [2,32–7,56]                                    | 2,91 [2,08–3,62]                                      | 0,378            |
| Kortizolio                     | 58,24 [9,87–155,48]                                 | 39,25 [14,51–95,47]                                   | 0,776            |
| GS                             | 0,44 [0,39–0,69]                                    | 0,64 [0,45–0,80]                                      | 0,067            |
| Antinksčių žievės              | 12,44 [4,50–41,89]                                  | 7,48 [3,17–15,33]                                     | 0,378            |
| TRH reaktyvacijos              | 0,44 [0,19–0,72]                                    | 0,42 [0,30–0,52]                                      | 0,838            |
| LMI                            | 0,59 [0,50–0,88]                                    | 0,80 [0,62–0,97]                                      | 0,197            |
| TMI                            | 0,90 [0,76–1,11]                                    | 0,75 [0,63–1,04]                                      | 0,154            |
| Starterio                      | 0,73 [0,49–1,03]                                    | 1,03 [0,76–1,27]                                      | 0,067            |
| Koreguoto GS                   | 0,31 [0,16–0,72]                                    | 0,69 [0,35–0,96]                                      | 0,067            |

CRB – C – reaktyvusis baltymas.



24 paveikslas. iBKTI medianos per 1 metus nuo biopsijos prarasto ir funkcionuojančio transplantato grupėse. Visų indeksų medianos tarp abiejų transplantato išėčių grupių reikšmingai nesiskyrė ( $p > 0,05$ ).

Toliau vertinome indeksų reikšmę visam transplantato išgyvenamumui. Atlikta daugialypė Kokso regresinė analizė, į modelį įtraukus visus nagrinėtus indeksus. Ilgesnis transplantato išgyvenamumas buvo tų pacientų, kurių TRH reaktyvacijos indeksas (monocitų ir limfocitų santykis) buvo didesnis (ŠS 0,250, 95 % PI 0,116–0,539,  $p < 0,001$ ) ir Starterio indeksas didesnis (ŠS 0,458, 95 % PI 0,215–0,973,  $p < 0,042$ ). Vis dėlto į modelį įdėjus chemokinus CXCL9/kre ir CXCL10/kre, tik TRH reaktyvacijos indeksas išliko reikšmingas transplantato išgyvenamumui (ŠS 0,213, 95 % PI 0,101–0,449,  $p < 0,001$ ).

## 6. REZULTATŲ APTARIMAS

I. Šlapimo biožymenų CXCL9 ir CXCL10 savybės diagnozuojant histologiškai patvirtintą inksto transplantato atmetimą

Šio darbo rezultatai rodo, jog abu chemokinai, tiek CXCL9, tiek CXCL10, pasižymi geromis diskriminacinėmis savybėmis atskiriant transplantato atmetimą nuo normalios histologijos ir, kiek mažesniu tikslumu, atmetimą nuo bet kokios kitos transplantato patologijos. Šio darbo rezultatai atitinka literatūroje publikuotus duomenis. Loon ir bendraautorių paskelbtame tyrime nurodytos šlapimo chemokino logCXCL9/kre ploto po kreive ROC AUC reikšmės diagnozuojant ūminį inksto transplantato atmetimą buvo 0,72 [109]. Mūsų duomenimis, CXCL9/kre ROC reikšmė buvo panaši – 0,73.

Vertindami CXCL10/kre gebėjimą atskirti antikūnų sukeltą atmetimą nuo kitų su atmetimu nesusijusių histologinių grupių, nustatėme ROC ploto po kreive reikšmę 0,75. Bent du nepriklausomi autoriai gavo gana artimą CXCL10/kre ROC reikšmę – 0,76 [125, 126]. Kitų autorių duomenimis, CXCL10/kre ROC reikšmė buvo 0,70 arba 0,74 [98, 109].

Mūsų duomenimis, tik chemokinas CXCL9/kre pasižymėjo pakankamomis diskriminacinėmis savybėmis atskiriant ląstelinio atmetimo atvejus nuo normalios histologijos, tačiau ne nuo visų kitų su atmetimu nesusijusių histologinių grupių. CXCL10/kre ploto po kreive reikšmės tiek atskiriant ląstelinį atmetimą nuo normos, tiek nuo visų kitų histologinių grupių buvo nepakankamos. Vis dėlto Ho su bendraautoriais nurodė, jog CXCL10 ROC reikšmė buvo 0,81 (95 % PI 0,74–0,88) atskiriant ląstelinį atmetimą, į šią studiją buvo įtrauktas 71 vidutinio ir ryškaus ląstelinio atmetimo atvejis. Tikėtina, kad tokie skirtumai galėjo būti gauti dėl to, kad mūsų tiriamoje pacientų grupėje buvo tik 9 ląstelinio atmetimo atvejai.

Vis dėlto nei CXCL9/kre, nei CXCL10/kre žymenys neleidžia nustatyti transplantato atmetimo tipo (antikūnų sukulto atmetimo nuo ląstelinio). Paprastai transplantato atmetimo gydymas kiekvieno iš šių tipų atveju skiriasi: antikūnų sukeltas atmetimas gydomas plazmaferezėmis, intraveniniu imunoglobulinu, rituksimabu, o ląstelinis atmetimas gydomas steroidinių hormonų infuzija arba antitimocitiniu imunoglobulinu [43, 127, 128]. Taigi vien chemokinių žymenų nepakanka tiksliai atmetimo diagnostikai, todėl prieš inicijuojant gydymą vis tiek reikia atlikti inksto transplantato biopsiją.

Šiame darbe nustatyta CXCL10/kre slenkstinė reikšmė atskiriant atmetimą nuo kitų histologinių radinių buvo 0,42 ng/mmol. Literatūroje pateikiamos gana įvairios slenkstinės vertės. Minkowski ir bendraautorių atliktoje studijoje

nurodyta optimali subklinikinę atmetimą rodanti slenkstinė CXCL10/kre reikšmė buvo 1,535 ng/mmol, o kliniškai išreikštą atmetimą rodanti slenkstinė CXCL10/kre reikšmė buvo 2,586 ng/mmol [82]. Vis dėlto šiame tyrime transplantato atmetimas vertintas ne pagal galutinę histologinio tyrimo išvadą, o pagal tris histologinius pokyčius pagal Banfo klasifikacinę sistemą – intersticiumo uždegimą (i), tubulitą (t) ir kraujagyslių intimos uždegimą (v), o subklinikinis ir kliniškai išreikštas transplantato atmetimas interpretuotas atitinkamai kaip atmetimas protokolinėse bei indikacinėse transplantato biopsijose. Kiti autoriai pateikė CXCL10/kre slenkstinę reikšmę 0,43 ng/mmol atskiriant atmetimą nuo visų kitų histologinių grupių – šis rezultatas labai artimas mūsų gautiems duomenims [71, 98].

Šio tyrimo metu nustatyta CXCL9/kre gera neigiama predikcinė reikšmė (82,5 %) ir nedidelė teigiama prognostinė reikšmė (48,1 %). CTOT-01 konsorciumo atliktame tyrime gautos didesnės CXCL9 predikcinės reikšmės diagnozuojant ūminį transplantato atmetimą: teigiama reikšmė buvo 67 %, o neigiama 96 % [96].

Mühlbacher su bendraautoriais pateikia duomenų, jog CXCL9, tačiau ne CXCL10 turi vertės diagnozuojant subklinikinį vėlyvąjį antikūnų sukeltą transplantato atmetimą, esant padidėjusiam DSA titrui [72]. Mūsų darbe tik nedidelei daliai pacientų buvo tirti donorui specifiniai antikūnai, todėl jų ryšio su chemokinių koncentracija tirti neturėjome galimybės.

Mūsų atlikto darbo pagrindu lyginant CXCL9 ir CXCL10 biožymenų savybes diagnozuojant inksto transplantato atmetimą, galima teigti, kad CXCL9/kre geriau identifikuoja atmetimą (tiek bendrai, tiek lėtelinį ir antikūnų sukeltą) nuo normalios histologijos, tačiau vienodai gerai kaip ir CXCL10/kre atskiria atmetimą nuo visų kitų histologinių grupių.

II. Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 ryšys su atskirais histologiniais pakitimais pagal Banfo klasifikacinę sistemą.

Šio tyrimo rezultatai rodo, kad CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijos buvo didesnės, esant labiau išreikštam intersticiumo uždegimui (i), peritubuliniam kapiliaritui (ptc) bei kraujagyslių intimos uždegimui (v). Glomerulitas buvo reikšmingai susijęs tik su CXCL10/kre reikšmėmis. Šiuos chemokinių ir histologinių pakitimų ryšius patvirtina ir kiti publikuoti straipsniai, be to, Arnau su bendraautoriais įrodė, jog CXCL10/kre buvo susijęs ne tik su g bei ptc balais, bet ir su lėtine glomerulopatija (cg) [85, 98, 125]. Vis dėlto kai kurie autoriai rado CXCL10/kre sąsają su peritubuliniu kapiliaritu, bet ne glomerulitu ar izoliuotu kraujagyslių intimos pažeidimu (v) [126].

Tai, kad šiame darbe tik CXCL10/kre buvo reikšmingai susijęs su glomerulitu, rodytų šio chemokino dalyvavimą antikūnų sukkelto atmetimo patogenezėje, nes glomerulitas yra vienas iš šio tipo atmetimo požymių [18]. O štai CXCL9/kre publikacijose pirmiausia buvo siejamas su ląstelinio atmetimu ir tubulitu, tačiau šiame darbe buvo palyginti nedidelis tubulito atvejų skaičius, todėl šis histologinis požymis analizuotas nesilaikant Banfo klasifikacinių kriterijų gradavimo (t0, t1, t2, t3), o sujungiant atvejus į dvi grupes (t0 ir t1–3) [83]. Galbūt dėl mažos imties nebuvo gauta reikšmingo ryšio tarp CXCL koncentracijos ir tubulito.

Taigi šio darbo duomenys rodo chemokinių ryšį su ūminio transplantato atmetimo histologine išraiška (tiek ląstelinio (v, i), tiek antikūnų sukkelto (g, ptc)), tačiau neradome aiškių sąsajų tarp lėtinio transplantato pažeidimo požymių ir chemokinių koncentracijos. Vis dėlto, panašiai kaip Arnau ir bendraautorijų publikuotame darbe, pastebėjome teigiamą koreliaciją tarp CXCL10/kre ir fibrozinio kraujagyslių intimos sustorėjimo (cv) [103]. Yra duomenų, kad CXCL10 dalyvauja inkstų audinio fibrozės patogenezėje, nes pelėms, kurių CXCL10 gamyba buvo užblokuota, sukėlus inkstų pažeidimą, fibrozė buvo švelnesnė nei kontrolinių pelių [129].

### III. Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 ryšys su kitomis inksto transplantato patologijomis (poliomos BK viruso infekcija, rekurentiniu glomerulonefritu)

Chemokinių koncentracija buvo padidėjusi histologiškai patvirtintos poliomos BK viruso nefropatijos atvejais ir reikšmingai nesiskyrė nuo transplantato atmetimo grupės. Tai atitinka ir literatūroje pateikiamus duomenis [56, 84, 101]. Yra žinoma, kad CXCL10 koncentracija kraujyje ir šlapime didėjo laipsniškai, esant skirtingo intensyvumo poliomos BK viruso sukeltam pažeidimui, pradedant nuo asimptominės viremijos ir baigiant poliomos BK viruso nefropatija bei transplantato funkcijos sutrikimu [101].

Įdomu, kad abiejų chemokinių koncentracija buvo padidėjusi trombinės mikroangiopatijos ir amiloidozės atveju, kiek mažiau – inersticinio nefrito atveju, tačiau esant difuzinei glomerulosklerozei, IgA nefropatijai ir kalcineurino inhibitorių toksiskumui, chemokinių koncentracija buvo maža.

Šio darbo tiriamųjų grupėje transplantato amiloidozė nustatyta tik vienam pacientui, tai buvo AA tipo amiloidozė. Kadangi AA amiloidozė yra su lėtinio užsėtęsusiu uždegimu susijusi liga, o chemokinai CXCL9 ir CXCL10 yra prouždegiminiai citokinai, todėl tikėtina, kad šių chemokinių koncentracija gali didėti sergant šia liga [131].

Trombinės mikroangiopatijos atveju CXCL10 koncentracija buvo gerokai daugiau padidėjusi nei CXCL9. Trombinė mikroangiopatija pasireiškia

smulkiųjų kraujagyslių tromboze ir organų pažeidimu, kai aktyvinama komplemento sistema [132]. Žinoma, kad CXCL10 dalyvauja trombinės mikroangiopatijos patogenezėje, nes skatina uždegimą ir imuninių ląstelių migraciją į pažeistas smulkias kraujagysles [133]. CXCL10 aktyvina T limfocitus ir makrofagus, taip skatindamas uždegiminį atsaką bei endotelio pažeidimą. CXCL10 dalyvavimą trombinės mikroangiopatijos patogenezėje pagrindžia ir tai, jog pacientams, sergantiems trombine mikroangiopatija, nustatoma padidėjusi CXCL10 koncentracija [134]. O duomenų apie CXCL9 koncentracijos pokyčius sergant trombine mikroangiopatija pateikiama mažai.

IgA nefropatijos patogenezė aiškinama defektyvaus IgA1 ir antikūnų prieš jį susiformavimu bei atsidėjimu inkstuose, kur jie sukelia imuninį atsaką ir tolesnį inkstų audinio pažeidimą [135]. Mūsų tyrtyje populiacijoje grįžtamosios IgA nefropatijos transplantate atvejais CXCL9 ir CXCL10 koncentracija šlapime nebuvo padidėjusi. V. L. Kung ir bendraautorių publikuotame darbe buvo atliekama IgA vaskulitu sergančių pacientų odos biopsijų bei IgA nefropatija ir su infekcija susijusiu glomerulonefritu sergančių inksto biopsijų transkriptų tyrimas. Paaiškėjo, kad padidėjusi CXCL9 transkripcija buvo būdinga tik su infekcija susijusio glomerulonefrito biopsiatuose [136]. Taigi šie duomenys neprieštarauja mūsų darbo rezultatams.

#### IV. Chemokinių CXCL9 ir CXCL10 ryšys su inksto transplantato prognoze

Šio tyrimo rezultatai rodo, kad padidėjusi CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracija ne tik koreliuoja su histologinio tyrimo rezultatu tuo metu, bet ir prognozuoja transplantato išeitį nepriklausomai nuo histologinio tyrimo rezultatų. Mūsų duomenimis, padidėjusi CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracija didina galutinės stadijos transplantato nepakankamumo riziką atitinkamai 5,16 ir 3,25 karto.

Chemokinių sąsajos su transplantato prognoze taip pat buvo vertintos ir kitų autorių. Nustatyta, kad iš tų pacientų, kuriems rasta maža ( $< 0,70$  ng/mmol) CXCL10 koncentracija, per 5 metus 95 % nepatyrė nepalankių išeikių (atmetimo, GFG sumažėjimo  $> 20$  % ar transplantato praradimo), o iš pacientų, kurių CXCL10 koncentracija buvo padidėjusi, per 5 m. nepalankių išeikių nepatyrė tik 78 % [97]. Kitų autorių duomenys rodo, kad CXCL10/kre koncentracija po 3 mėn. nuo transplantacijos leido prognozuoti ūminį transplantato atmetimą, kad ir kokie būtų tuo metu atliktos protokolinės transplantato biopsijos rezultatai, o autorių nustatyta CXCL10/kre ribinė reikšmė buvo 2,79 ng/mmol [89]. Taip pat viena publikacija parodė, jog didesnė CXCL10 koncentracija 1 mėn. po transplantacijos buvo susijusi su blogesne transplantato veikla po 6 mėn. nuo transplantacijos [130].

Apie CXCL9/kre ir transplantato išeitis publikacijų yra mažiau. CTOT studija, vertinusi CXCL9 reikšmę inksto transplantato atmetimo diagnostikai, parodė, kad maža CXCL9 koncentracija 6 mėn. po inksto transplantacijos rodė gerą transplantato prognozę (be atmetimo ar GFG mažėjimo rizikos) 6–24 mėn. po transplantacijos, jų nustatyta neigiama prognostinė reikšmė buvo 92,5–99,3 % [96]. Mūsų duomenys rodo, kad CXCL9 prognostinė vertė nenusileidžia plačiau publikacijose nagrinėtam chemokinui CXCL10.

Įdomu, kad šiame darbe mažesnė CXCL9/kre koncentracija buvo susijusi su geresniu recipiento išgyvenamumu: esant mažesnei nei 0,11 ng/mmol koncentracijai, nebuvo užfiksuota nė vieno paciento mirties stebėjimo laikotarpiu. Aptikta geresnio recipiento išgyvenamumo tendencija ir mažesnės CXCL10/kre koncentracijos recipientų grupėje, tačiau reikšmingo skirtumo nuo padidėjusios CXCL10/kre koncentracijos grupės vis dėlto negauta.

V. Išvestinių bendro kraujo rodiklių indeksų ryšys su chemokinais CXCL9 bei CXCL10 ir transplantato atmetimu bei prognoze.

Mūsų žiniomis, literatūroje dar nėra publikuota duomenų apie funkcijų biologijos indeksų naudojimą imunosupresuotiems ligoniams tirti. Kadangi pacientai po inksto transplantacijos nuolat vartoja palaikomąją imunosupresiją, į kurią dažniausiai įeina ir kortikosteroidai, smarkiai veikiantys pagumburio–hipofizės–antinksčių ašį ir turintys šiems hormonams būdingą poveikį audiniams, tai gali turėti įtakos ir funkcijų biologijos indeksų reikšmėms. Tikėtina, jog funkcijų biologijos indeksų normos reikšmės buvo nustatytos tiriant populiaciją, kurioje pacientų po inksto transplantacijos galėjo ir nebūti, todėl nėra labai aišku, kaip vertinti indekso nuokrypį nuo nustatyto normos reikšmių intervalo – ar indekso reikšmė rodo inksto recipiento sveikatos būklės normos variantą, ar patologiją.

CXCL9/kre ir CXCL10/kre reikšmės tiesiogiai koreliavo su adaptacijos ir genitotiroidinio santykio indekso reikšmėmis, tačiau tik adaptacijos indekso vertės reikšmingai skyrėsi normalios bei padidėjusios CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijos grupėse. Taip pat tik adaptacijos indeksas reikšmingai padėjo atskirti histologiškai nustatytą transplantato atmetimą nuo normos ar kitos patologijos, nors ploto po kreive reikšmė nusileido chemokinų ploto po kreive reikšmėms, o 95 % PI vos viršijo slenkstinę reikšmę. Įdomu, kad daugumos pacientų, kuriems buvo atlikta transplantacija, adaptacijos indekso reikšmės buvo mažesnės nei bendros populiacijos norma, o „normalios“ ir padidėjusios adaptacijos indekso reikšmės buvo susijusios su transplantato atmetimu ir kita, su atmetimu nesusijusia, transplantato

patologija. Taip pat net „per mažos“, tačiau arčiau normos ribų esančios adaptacijos indekso reikšmės buvo susijusios su transplantato atmetimu. Taigi galima daryti prielaidą, kad pacientų, kuriems atlikta transplantacija, vartojančių palaikomąją imunosupresiją, adaptacijos indekso vertinimas ir normos turėtų būti kitokie nei bendros populiacijos.

Kadangi adaptacijos indeksas apskaičiuojamas dalinant eozinofilus iš monocitų (vertinamų procentine išraiška), derėtų pasigilinti į imunosupresantų ir atmetimo sąsajas su šiomis kraujo ląstelėmis. Yra žinoma, kad imunosupresantai, tokie kaip kortikosteroidai, mažina eozinofilų kiekį kraujyje [137]. Taip pat yra duomenų, jog neretai prieš prasidedant limfocitų sukeltam transplantato atmetimui gali būti nustatoma eozinofilija, o sėkmingas tokio atmetimo gydymas kortikosteroidais sumažina eozinofilų kiekį kraujyje [138, 139]. Kiti imunosupresantai taip pat turi įtakos šioms kraujo ląstelėms: kalcineurino inhibitorius takrolimas mažina eozinofilų kiekį kraujyje skatindamas jų apoptozę [140], tačiau monocitų funkcijai didelės klinikinės reikšmės neturi, tik veikia makrofagų poliarizaciją [141]. Vis dėlto yra nustatyta, kad absoliutus monocitų skaičius po transplantacijos sumažėja, tačiau gali išlikti kai kurių monocitų subtipų gebėjimas produkuoti citokinus, tarp jų ir gama interferoną, o šis rusenantis uždegimo šaltinis gali lemti ląstelinio atmetimo išsivystymą [142]. Taigi apibendrinant galima teigti, kad veikiant imunosupresantams, mažėja eozinofilų kiekis kraujyje, todėl gaunamos mažesnės adaptacijos indekso reikšmės. Jei imunosupresantų poveikis eozinofilams mažėja, tai gali rodyti ir mažesnę šių vaistų imunosupresinį efektą bei didėjančią transplantato atmetimo riziką. Tad transplantato recipientų populiacijai negalima taikyti įprastų šio indekso normų interpretuojant adaptacijos indekso reikšmes. Reikia atlikti didesnės apimties ir detalesnę analizę norint nustatyti pacientams, kuriems atlikta transplantacija, optimalias adaptacijos indekso reikšmes, lemiančias mažiausią transplantato atmetimo ir infekcinių komplikacijų riziką.

Tikėtina, kad daugiausia informacijos apie pacientui, kuriam atlikta transplantacija, optimalias adaptacijos indekso reikšmes galima gauti vertinant to paties paciento adaptacijos indekso dinamiką ir ją sugretinant su potransplantacine paciento sveikimo eiga: kokios indekso reikšmės būna esant stabiliai transplantato funkcijai, o kokios – vystantis atmetimui ar prasidedant infekcinei ligai.

Endobiogenikos metodas adaptacijos indeksą, skaičiuojamą dalinant eozinofilų procentinį skaičių iš monocitų procentinio skaičiaus, aiškina kaip AKTH aktyvumo santykinį palyginimą su FSH aktyvumu, teigdamas, kad eozinofilų kiekis kraujyje atspindi AKTH aktyvumą, o monocitų skaičius atspindi FSH veikimą, tačiau tiesioginių to įrodymų nepateikiama.

Yra žinoma, kad AKTH sukelia eozinofilų kiekio sumažėjimą kraujyje pirmiausia skatindamas gliukokortikoidų sekreciją antinksčiuose [143]. Padidėjęs gliukokortikoidų kiekis kraujyje mažina eozinofilų išgyvenamumą ir slopina migraciją, taip sumažinamas cirkuliuojančių eozinofilų kiekis [144]. Tiriant Kušingo sindromu sergančius pacientus, pastebėta, kad dideli kortizolio kiekiai organizme yra susiję su eozinofilų koncentracijos sumažėjimu [145]. Padidėjusi gliukokortikoidų koncentracija ne tik mažina eozinofilų kiekį kraujyje, bet ir grįžtamojo ryšio mechanizmu slopina AKTH sekreciją. Taigi literatūroje eozinofilų kiekio sumažėjimas labiau siejamas su padidėjusiu gliukokortikoidų aktyvumu nei su tiesioginiu AKTH veikimu.

Tiesioginių įrodymų, siejančių FSH aktyvumą su monocitų koncentracija kraujyje, nepakanka, tačiau yra duomenų, jog padidėjusi FSH koncentracija pomenopauzinio amžiaus moterims yra susijusi su padidėjusiu monocitų kiekiu kraujyje, taip pat didesne plazmos prouždegiminių citokinų, tokių kaip TNF- $\alpha$  ir IL-6, koncentracija, o šie savo ruožtu siejami su monocitų aktyvinimu ir proliferacija [146]. FSH receptorių randama ne tik kiaušidžių ląstelėse, bet ir monocituose, tačiau gerokai mažiau [147]. Tai leidžia monocitams reaguoti į FSH poveikį, bet signalo perdavimo mechanizmai skiriasi nuo esančių lytiniuose organuose, nes monocitai negamina cAMP veikiant FSH, o cAMP yra dažniausias atsako į FSH kelias kiaušidėse [147].

Jei šiuo požiūriu vertintume mūsų turimus rezultatus, pacientų, kuriems atlikta transplantacija, AKTH aktyvumas būtų kur kas mažesnis (arba kortikosteroidų (labiausiai tikėtina – egzogeninių, medikamentinių) aktyvumas būtų didesnis), palyginti su FSH aktyvumu, o jei šis santykis ima keistis AKTH aktyvumo (kortikosteroidinio poveikio susilpnėjimo) naudai, kyla transplantato atmetimo rizika. Tyrimai rodo, kad kortikotropinė ašis, taigi ir AKTH sekrecija, būna slopinama pacientams po transplantacijos, vartojantiems kortikosteroidus, taip pat šiems pacientams yra didesnė antinksčių nepakankamumo rizika [148]. Taigi šie duomenys teoriškai atitiktų ir mūsų gautus rezultatus, tačiau norint patvirtinti arba paneigti šį ryšį, reikia nuodugnesnių tyrimų.

Vienos studijos duomenimis, moterims recipientėms po transplantacijos buvo nustatyta didesnė FSH koncentracija, palyginti su sveikomis moterimis, kurioms neatlikta transplantacija [149]. Vis dėlto kiti tyrimai rodo, kad sveikų moterų ir pacienčių po transplantacijos FSH koncentracija buvo panaši [150]. Tyrimai vyrų populiacijoje, lyginantys sergančiuosius lėtine inkstų liga ir pacientus po inksto transplantacijos, nustatė, kad FSH koncentracijos reikšmingai nesiskyrė [151]. Kitų studijų duomenimis, dializuojamų vyrų FSH koncentracija buvo padidėjusi, o po transplantacijos, taip pat ir taikant gydymą eritropoetinu, FSH koncentracija mažėjo ir buvo susijusi su

pagerėjusia spermatogeneze [152]. Taigi bendra tendencija yra ta, kad esant inkstų nepakankamumui, FSH koncentracija padidėja, o po transplantacijos ji ima mažėti ir grįžta į sveikiems asmenims būdingą lygį. Kadangi AKTH yra smarkiai slopinamas vartojamų kortikosteroidų, tikėtina, kad pacientams, kuriems atlikta transplantacija, FSH santykinis aktyvumas ir poveikis audiniams gali būti didesnis, palyginti su AKTH.

Mūsų gautais duomenimis, didesnis monocitų ir limfocitų santykis buvo susijęs su geresniu transplantato išgyvenamumu. Vis dėlto reikėtų atsižvelgti į tai, kad daugiau nei 90 % tiriamų pacientų šis santykis buvo padidėjęs, taigi lyginamos grupės buvo gana netolygios ir reikėtų detalesnių tyrimų šiam ryšiui patvirtinti. Vis dėlto literatūroje pateikiama duomenų, jog per mažas limfocitų skaičius gali būti susijęs su blogesnėmis transplantato išeitimis [153]. Taip pat kai kurių monocitų subtipų padidėjimas siejamas su blogesne inksto transplantato funkcija [154]. Padidėjęs monocitų ir limfocitų santykis siejamas su stipresniu uždegimu ir didesne kardiovaskulinių mirčių rizika sergantiesiems lėtine inkstų liga [155, 156]. Tačiau duomenų apie monocitų ir limfocitų santykio ryšį su transplantato prognoze rasti nepavyko.

## 7. KLINIKINIS TAIKYMAS

Šio darbo rezultatai patvirtina, kad biožymenys CXCL9 ir CXCL10 leidžia atskirti tuos inksto transplantato recipientus, kuriems yra transplantato atmetimas, nuo tų, kurių transplantato histologija yra normali arba jiems yra kitų su atmetimu nesusijusių pakitimų. Kadangi chemokinių nustatymas šlapime yra neinvazinis, palyginti nesudėtingai atliekamas tyrimas, jis galėtų būti plačiai taikomas recipientams po inksto transplantacijos stebėti: reguliariai atliekant šlapimo chemokinių tyrimą, jei chemokinių koncentracija šlapime, tyrimo duomenimis, nepadidėjusi, tokiems pacientams galima nedaryti protokolinių inksto biopsijų ir taip išvengti papildomų išlaidų sveikatos priežiūrai bei diskomforto ir intervencijos sukeltos rizikos pacientui. Kita vertus, jei recipiento transplantato funkcija stabili, o šlapime aptinkama padidėjusi chemokinių koncentracija, galima įtarti subklinikinį inksto transplantato atmetimą, todėl tokiam pacientui būtų indikuotina atlikti transplantato biopsiją ir, patvirtinus atmetimą, anksti skirti atmetimo gydymą, taip užkertant kelią transplantato funkcijos pablogėjimui ir transplantato praradimui.

Vis dėlto chemokinių CXCL9 ir CXCL10 koncentracija šlapime gali padidėti esant transplantuoto inksto poliomos BK viruso nefropatijai, ir šis padidėjimas nesiskiria nuo to, kuris būna transplantato atmetimo atveju, todėl diferencinei diagnostikai reikėtų atlikti poliomos BK viruso DNR tyrimą šlapime arba kraujyje.

Kadangi CXCL9 ir CXCL10 yra ankstyvi transplantato pažeidimo žymenys, ankstyvesni nei transplantato funkcijai vertinti įprastai naudojamas kreatininas, jie galėtų būti naudojami sprendžiant dėl imunosupresijos dozavimo ir skyrimo, pavyzdžiui, esant normaliai chemokinių koncentracijai šlapime, imunosupresiją būtų galima sumažinti, o pradėjus didėti šių žymenų koncentracijai – laiku padidinti imunosupresantų dozes [130]. Vis dėlto tokioms prielaidoms pagrįsti reikia daugiau duomenų.

Dar vienas chemokinių tyrimo pranašumas atsirastų, jei chemokinių testą pacientas galėtų atlikti namuose, savistabai, panašiai kaip naudojami greitieji (angl. *point of care*) testai kitoms būklėms (infekcijoms, nėštumui) diagnozuoti. Link tokio testo kūrimo jau einama, 2022 m. publikuotas vokiečių mokslininkų grupės straipsnis apie antikūno-aptamero hibridinį šoninės tėkmės testą CXCL9 nustatyti, šio testo jautrumas ir specifiskumas siekė 71 % [157]. Toks testas leistų pacientams sekti transplantato būklę namuose: jei testas chemokino padidėjimo nerodytų, pacientas galėtų praleisti vizitą pas gydytoją nefrologą, o tai suteiktų daugiau komforto toli nuo transplantacijos centro gyvenantiems pacientams, sutaupytų laiko ir lėšų tiek

sveikatos priežiūros įstaigai, tiek pacientui. Kita vertus, jei greitas chemokinių testas aptiktų padidėjusią žymens koncentraciją, pacientas galėtų laiku ir tikslingai nuvykti pas nefrologą ir būtų laiku koreguotas gydymas, taip išsaugant transplantato funkciją kuo ilgiau.

Taigi chemokinių CXCL9 ir CXCL10 tyrimo duomenys neabejotinai suteiktų pridėtinės vertės prižiūrint pacientus po inkstų transplantacijos: jų taikymas galėtų prisidėti gerinant inksto transplantatų išgyvenamumą ir recipientų gyvenimo kokybę.

Taikant endobiogenikos metodą naudojami iBKT iki šiol nebuvo nagrinėti pacientų, kuriems atlikta transplantacija ir kurie nuolat vartoja imunosupresinį gydymą, populiacijoje, todėl nebuvo pakankamai duomenų, kaip interpretuoti indeksų vertes, kai pacientas naudoja kortikotropinę ašį veikiančius medikamentus. Šis tyrimas parodė, kad tokių pacientų populiacijai negalima tiesiogiai pritaikyti pagal bendrąją populiaciją sudarytų indeksų normos reikšmių intervalų, nes žemiau bendrosios populiacijos normos esančios, tačiau artėjančios prie normos adaptacijos indekso reikšmės gali rodyti transplantato atmetimą. Kadangi tai pirmasis ir palyginti heterogenišką pacientų, kuriems atlikta transplantacija, grupę įtraukęs tyrimas, reikalingi platesnės apimties tokių pacientų tyrimai, leidžiantys nustatyti šios populiacijos normalias ir patologiją rodančias eozinofilų ir monocitų santykio reikšmes.

Šiame darbe nagrinėti indeksai apskaičiuojami įvertinant bendro kraujo tyrimo rodiklius, o tai daug papildomų lėšų nereikalaujantis ir lengvai atliekamas tyrimas, kuris galėtų suteikti papildomos informacijos gydytojui prieš apsisprendžiant skirti išsamesnius tyrimus dėl galimos infekcijos ar transplantato atmetimo, taip pat vertinant ligos eigą ar dozuojant imunosupresantus, tačiau dar reikėtų papildomų platesnės apimties tyrimų.

## 8. IŠVADOS

- CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracija šlapime padidėja inksto transplantato atmetimo atveju ir yra reikšmingai didesnė nei normalios histologijos arba su atmetimu nesusijusios transplantato patologijos atveju.
- CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracija yra didesnė, esant labiau išreikštam intersticiumo uždegimui (i), peritubuliniam kapiliaritui (ptc) ir kraujagyslių intimos uždegimui (v). Glomerulitas yra reikšmingai susijęs tik su CXCL10/kre reikšmėmis.
- CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracija šlapime yra reikšmingai padidėjusi esant poliomos BK viruso nefropatijai, palyginti su normalios histologijos atvejais, tačiau nesiskiria nuo padidėjimo transplantato atmetimo metu.
- Padidėjusi CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracija šlapime yra susijusi su blogesniu inksto transplantato ir recipientų išgyvenamumu.
- Didėsnis eozinofilų ir monocitų santykis yra reikšmingai susijęs su CXCL9/kre ir CXCL10/kre koncentracijos šlapime padidėjimu ir inksto transplantato atmetimu.

## 9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Sundström, J.; Bodegard, J.; Bollmann, A.; Vervloet, M.G.; Mark, P.B.; Karasik, A.; Taveira-Gomes, T.; Botana, M.; Birkeland, K.I.; Thuresson, M.; et al. Prevalence, Outcomes, and Cost of Chronic Kidney Disease in a Contemporary Population of 2·4 Million Patients from 11 Countries: The CaReMe CKD Study. *Lancet Reg Health Eur* **2022**, *20*, 100438, doi:10.1016/j.lanepe.2022.100438.
2. Jager, K.J.; Kovesdy, C.; Langham, R.; Rosenberg, M.; Jha, V.; Zoccali, C. A Single Number for Advocacy and Communication-Worldwide More than 850 Million Individuals Have Kidney Diseases. *Kidney Int* **2019**, *96*, 1048–1050, doi:10.1016/j.kint.2019.07.012.
3. Bello, A.K.; Okpechi, I.G.; Levin, A.; Ye, F.; Damster, S.; Arruebo, S.; Donner, J.-A.; Caskey, F.J.; Cho, Y.; Davids, M.R.; et al. An Update on the Global Disparities in Kidney Disease Burden and Care across World Countries and Regions. *The Lancet Global Health* **2024**, *12*, e382–e395, doi:10.1016/S2214-109X(23)00570-3.
4. Beckwith, H.; Brown, E.A. Health-Related Quality of Life in Kidney Transplant Recipients: Can We Do Better? *Nephrol Dial Transplant* **2023**, *38*, 1580–1582, doi:10.1093/ndt/gfad060.
5. Nemati, E.; Einollahi, B.; Lesan Pezeshki, M.; Porfarziani, V.; Fattahi, M.R. Does Kidney Transplantation with Deceased or Living Donor Affect Graft Survival? *Nephrourol Mon* **2014**, *6*, e12182, doi:10.5812/numonthly.12182.
6. Sellarés, J.; de Freitas, D.G.; Mengel, M.; Reeve, J.; Einecke, G.; Sis, B.; Hidalgo, L.G.; Famulski, K.; Matas, A.; Halloran, P.F. Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence. *Am J Transplant* **2012**, *12*, 388–399, doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x.
7. Sethi, S.; Ammerman, N.; Vo, A.; Jordan, S.C. Approach to Highly Sensitized Kidney Transplant Candidates and a Positive Crossmatch. *Adv Chronic Kidney Dis* **2021**, *28*, 587–595, doi:10.1053/j.ackd.2021.09.004.
8. Krishnamoorthy, S.; Kyeso, Y. Challenges of Diagnosing Antibody-Mediated Rejection: The Role of Invasive and Non-Invasive Biomarkers. *Medicina (Kaunas)* **2021**, *57*, 439, doi:10.3390/medicina57050439.
9. Merrill, J.P. SUCCESSFUL HOMOTRANSPLANTATION OF THE HUMAN KIDNEY BETWEEN IDENTICAL TWINS. *JAMA* **1956**, *160*, 277, doi:10.1001/jama.1956.02960390027008.

10. Bergan, A. Ancient Myth, Modern Reality: A Brief History of Transplantation. *J Biocommun* **1997**, *24*, 2–9.
11. Terasaki, P.I.; McClelland, J.D. MICRODROPLET ASSAY OF HUMAN SERUM CYTOTOXINS. *Nature* **1964**, *204*, 998–1000, doi:10.1038/204998b0.
12. Groth, C.G.; Brent, L.B.; Calne, R.Y.; Dausset, J.B.; Good, R.A.; Murray, J.E.; Shumway, N.E.; Schwartz, R.S.; Starzl, T.E.; Terasaki, P.I.; et al. Historic Landmarks in Clinical Transplantation: Conclusions from the Consensus Conference at the University of California, Los Angeles. *World j. surg.* **2000**, *24*, 834–843, doi:10.1007/s002680010134.
13. Calne, R.Y.; Thiru, S.; McMaster, P.; Craddock, G.N.; White, D.J.G.; Evans, D.B.; Dunn, D.C.; Pentlow, B.D.; Rolles, K. CYCLOSPORIN A IN PATIENTS RECEIVING RENAL ALLOGRAFTS FROM CADAVER DONORS. *The Lancet* **1978**, *312*, 1323–1327, doi:10.1016/S0140-6736(78)91970-0.
14. Miglinas, M.; Rimsevicius, L.; Zelvy, A. Lithuania Celebrates 50 Years of Kidney Transplantation. *Artificial Organs* **2020**, *44*, 228–230, doi:10.1111/aor.13607.
15. Miglinas, M.; Vaiciuniene, R.; Vickiene, A. Organ Transplantation in Lithuania. *Transplantation* **2019**, *103*, 1287–1289, doi:10.1097/TP.0000000000002575.
16. Al-Adra, D.; Al-Qaoud, T.; Fowler, K.; Wong, G. De Novo Malignancies after Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* **2022**, *17*, 434–443, doi:10.2215/CJN.14570920.
17. Agrawal, A.; Ison, M.G.; Danziger-Isakov, L. Long-Term Infectious Complications of Kidney Transplantation. *CJASN* **2022**, *17*, 286–295, doi:10.2215/CJN.15971020.
18. Haas, M.; Loupy, A.; Lefaucheur, C.; Roufosse, C.; Glotz, D.; Seron, D.; Nankivell, B.J.; Halloran, P.F.; Colvin, R.B.; Akalin, E.; et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised Diagnostic Criteria for Chronic Active T Cell-Mediated Rejection, Antibody-Mediated Rejection, and Prospects for Integrative Endpoints for next-Generation Clinical Trials. *Am J Transplant* **2018**, *18*, 293–307, doi:10.1111/ajt.14625.
19. Naesens, M.; Roufosse, C.; Haas, M.; Lefaucheur, C.; Mannon, R.B.; Adam, B.A.; Aubert, O.; Böhmig, G.A.; Callemeyn, J.; Claessen-van Groningen, M.; et al. The Banff 2022 Kidney Meeting Report: Reappraisal of Microvascular Inflammation and the Role of Biopsy-

- Based Transcript Diagnostics. *American Journal of Transplantation* **2024**, *24*, 338–349, doi:10.1016/j.ajt.2023.10.016.
20. Doberer, K.; Schiemann, M.; Strassl, R.; Haupenthal, F.; Dermuth, F.; Görzer, I.; Eskandary, F.; Reindl-Schwaighofer, R.; Kikić, Ž.; Puchhammer-Stöckl, E.; et al. Torque Teno Virus for Risk Stratification of Graft Rejection and Infection in Kidney Transplant Recipients—A Prospective Observational Trial. *Am J Transplant* **2020**, *20*, 2081–2090, doi:10.1111/ajt.15810.
  21. Xu, H.; He, X. Developments in Kidney Xenotransplantation. *Front Immunol* **2023**, *14*, 1242478, doi:10.3389/fimmu.2023.1242478.
  22. Newell, K.A.; Adams, A.B.; Turka, L.A. Biomarkers of Operational Tolerance Following Kidney Transplantation - The Immune Tolerance Network Studies of Spontaneously Tolerant Kidney Transplant Recipients. *Hum Immunol* **2018**, *79*, 380–387, doi:10.1016/j.humimm.2018.02.007.
  23. Klein, A.; Loupy, A.; Stegall, M.; Helanterä, I.; Kosinski, L.; Frey, E.; Aubert, O.; Divard, G.; Newell, K.; Meier-Kriesche, H.-U.; et al. Qualifying a Novel Clinical Trial Endpoint (iBOX) Predictive of Long-Term Kidney Transplant Outcomes. *Transpl Int* **2023**, *36*, 11951, doi:10.3389/ti.2023.11951.
  24. Benning, L.; Morath, C.; Fink, A.; Rudek, M.; Speer, C.; Kälble, F.; Nussbag, C.; Beimler, J.; Schwab, C.; Waldherr, R.; et al. Donor-Derived Cell-Free DNA (Dd-cfDNA) in Kidney Transplant Recipients With Indication Biopsy—Results of a Prospective Single-Center Trial. *Transpl Int* **2023**, *36*, 11899, doi:10.3389/ti.2023.11899.
  25. Ibi, Y.; Nishinakamura, R. Kidney Bioengineering for Transplantation. *Transplantation* **2023**, *107*, 1883–1894, doi:10.1097/TP.0000000000004526.
  26. Siu, J.H.Y.; Surendrakumar, V.; Richards, J.A.; Pettigrew, G.J. T Cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* **2018**, *9*, 2548, doi:10.3389/fimmu.2018.02548.
  27. Herrera, O.B.; Golshayan, D.; Tibbott, R.; Salcido Ochoa, F.; James, M.J.; Marelli-Berg, F.M.; Lechler, R.I. A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells. *J Immunol* **2004**, *173*, 4828–4837, doi:10.4049/jimmunol.173.8.4828.
  28. Leibler, C.; Thiolat, A.; Elsner, R.A.; El Karoui, K.; Samson, C.; Grimbert, P. Costimulatory Blockade Molecules and B-Cell-Mediated Immune Response: Current Knowledge and Perspectives. *Kidney Int* **2019**, *95*, 774–786, doi:10.1016/j.kint.2018.10.028.

29. Van Der Zwan, M.; Hesselink, D.A.; Van Den Hoogen, M.W.F.; Baan, C.C. Costimulation Blockade in Kidney Transplant Recipients. *Drugs* **2020**, *80*, 33–46, doi:10.1007/s40265-019-01226-6.
30. Ng, Y.-H.; Oberbarnscheidt, M.H.; Chandramoorthy, H.C.K.; Hoffman, R.; Chalasani, G. B Cells Help Alloreactive T Cells Differentiate into Memory T Cells. *Am J Transplant* **2010**, *10*, 1970–1980, doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03223.x.
31. Zeng, Q.; Ng, Y.-H.; Singh, T.; Jiang, K.; Sheriff, K.A.; Ippolito, R.; Zahalka, S.; Li, Q.; Randhawa, P.; Hoffman, R.A.; et al. B Cells Mediate Chronic Allograft Rejection Independently of Antibody Production. *J Clin Invest* **2014**, *124*, 1052–1056, doi:10.1172/JCI70084.
32. Nasr, M.; Sigdel, T.; Sarwal, M. Advances in Diagnostics for Transplant Rejection. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2016**, *16*, 1121–1132, doi:10.1080/14737159.2016.1239530.
33. Naik, R.H.; Shawar, S.H. Renal Transplantation Rejection. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2024.
34. Callemeyn, J.; Lamarthée, B.; Koenig, A.; Koshy, P.; Thaunat, O.; Naesens, M. Allorecognition and the Spectrum of Kidney Transplant Rejection. *Kidney International* **2022**, *101*, 692–710, doi:10.1016/j.kint.2021.11.029.
35. Lai, X.; Zheng, X.; Mathew, J.M.; Gallon, L.; Leventhal, J.R.; Zhang, Z.J. Tackling Chronic Kidney Transplant Rejection: Challenges and Promises. *Front Immunol* **2021**, *12*, 661643, doi:10.3389/fimmu.2021.661643.
36. Hara, S. Current Pathological Perspectives on Chronic Rejection in Renal Allografts. *Clin Exp Nephrol* **2017**, *21*, 943–951, doi:10.1007/s10157-016-1361-x.
37. Cucchiari, D.; Podestà, M.A.; Ponticelli, C. Pathophysiology of Rejection in Kidney Transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* **2024**, *20*, 1471–1481, doi:10.1080/1744666X.2024.2421310.
38. Davis, S.; Cooper, J.E. Acute Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation Reviews* **2017**, *31*, 47–54, doi:10.1016/j.trre.2016.10.004.
39. Groom, J.R.; Luster, A.D. CXCR3 Ligands: Redundant, Collaborative and Antagonistic Functions. *Immunol Cell Biol* **2011**, *89*, 207–215, doi:10.1038/icb.2010.158.
40. Sarwal, M.; Chua, M.-S.; Kambham, N.; Hsieh, S.-C.; Satterwhite, T.; Masek, M.; Salvatierra, O. Molecular Heterogeneity in Acute Renal Allograft Rejection Identified by DNA Microarray Profiling. *N Engl J Med* **2003**, *349*, 125–138, doi:10.1056/NEJMoa035588.

41. Buscher, K.; Heitplatz, B.; Van Marck, V.; Song, J.; Loismann, S.; Rixen, R.; Hüchtmann, B.; Kurian, S.; Ehinger, E.; Wolf, D.; et al. Data-Driven Kidney Transplant Phenotyping as a Histology-Independent Framework for Biomarker Discovery. *JASN* **2021**, *32*, 1933–1945, doi:10.1681/ASN.2020121685.
42. Madill-Thomsen, K.; Perkowska-Ptasińska, A.; Böhmig, G.A.; Eskandary, F.; Einecke, G.; Gupta, G.; Halloran, P.F. Discrepancy Analysis Comparing Molecular and Histology Diagnoses in Kidney Transplant Biopsies. *American Journal of Transplantation* **2020**, *20*, 1341–1350, doi:10.1111/ajt.15752.
43. Voora, S.; Adey, D.B. Management of Kidney Transplant Recipients by General Nephrologists: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis* **2019**, *73*, 866–879, doi:10.1053/j.ajkd.2019.01.031.
44. Hashmi, A.J.; Bujáki, B.; Bidiga, L.; Kardos, L.; Nemes, B.; Balla, J.; Szabó, R.P. Relevance of Proteinuria in Kidney Transplant Recipients and Allograft Outcomes. *Transplantation Proceedings* **2024**, *56*, 1273–1279, doi:10.1016/j.transproceed.2024.06.002.
45. Solez, K.; Axelsen, R.A.; Benediktsson, H.; Burdick, J.F.; Cohen, A.H.; Colvin, R.B.; Croker, B.P.; Droz, D.; Dunnill, M.S.; Halloran, P.F.; et al. International Standardization of Criteria for the Histologic Diagnosis of Renal Allograft Rejection: The Banff Working Classification of Kidney Transplant Pathology. *Kidney International* **1993**, *44*, 411–422, doi:10.1038/ki.1993.259.
46. Loupy, A.; Mengel, M.; Haas, M. Thirty Years of the International Banff Classification for Allograft Pathology: The Past, Present, and Future of Kidney Transplant Diagnostics. *Kidney International* **2022**, *101*, 678–691, doi:10.1016/j.kint.2021.11.028.
47. Halloran, P.F.; Madill-Thomsen, K.S.; Reeve, J. The Molecular Phenotype of Kidney Transplants: Insights From the MMDx Project. *Transplantation* **2024**, *108*, 45–71, doi:10.1097/TP.0000000000004624.
48. Sis, B.; Halloran, P.F. Endothelial Transcripts Uncover a Previously Unknown Phenotype: C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection: *Current Opinion in Organ Transplantation* **2010**, *15*, 42–48, doi:10.1097/MOT.0b013e3283352a50.
49. Ho, Q.Y.; Lim, C.C.; Tan, H.Z.; Sultana, R.; Kee, T.; Htay, H. Complications of Percutaneous Kidney Allograft Biopsy: Systematic Review and Meta-Analysis. *Transplantation* **2022**, *106*, 1497–1506, doi:10.1097/TP.0000000000004033.
50. Lee, D.M.; Abecassis, M.M.; Friedewald, J.J.; Rose, S.; First, M.R. Kidney Graft Surveillance Biopsy Utilization and Trends: Results From

- a Survey of High-Volume Transplant Centers. *Transplant Proc* **2020**, *52*, 3085–3089, doi:10.1016/j.transproceed.2020.04.1816.
51. Loupy, A.; Lefaucheur, C.; Vernerey, D.; Prugger, C.; Van Huyen, J.-P.D.; Mooney, N.; Suberbielle, C.; Frémeaux-Bacchi, V.; Méjean, A.; Desgrandchamps, F.; et al. Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival. *N Engl J Med* **2013**, *369*, 1215–1226, doi:10.1056/NEJMoa1302506.
  52. Cooper, J.E.; Gralla, J.; Chan, L.; Wiseman, A.C. Clinical Significance of Post Kidney Transplant de Novo DSA in Otherwise Stable Grafts. *Clin Transpl* **2011**, 359–364.
  53. Filippone, E.J.; Farber, J.L. Histologic Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection in the Absence of Donor-Specific HLA Antibodies. *Transplantation* **2021**, *105*, e181–e190, doi:10.1097/TP.0000000000003797.
  54. Bloom, R.D.; Bromberg, J.S.; Poggio, E.D.; Bunnapradist, S.; Langone, A.J.; Sood, P.; Matas, A.J.; Mehta, S.; Mannon, R.B.; Sharfuddin, A.; et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *JASN* **2017**, *28*, 2221–2232, doi:10.1681/ASN.2016091034.
  55. Huang, E.; Sethi, S.; Peng, A.; Najjar, R.; Mirocha, J.; Haas, M.; Vo, A.; Jordan, S.C. Early Clinical Experience Using Donor-Derived Cell-Free DNA to Detect Rejection in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* **2019**, *19*, 1663–1670, doi:10.1111/ajt.15289.
  56. Mayer, K.A.; Omic, H.; Weseslindtner, L.; Doberer, K.; Reindl-Schwaighofer, R.; Viard, T.; Tillgren, A.; Haindl, S.; Casas, S.; Eskandary, F.; et al. Levels of Donor-Derived Cell-Free DNA and Chemokines in BK Polyomavirus-Associated Nephropathy. *Clin Transplant* **2022**, *36*, e14785, doi:10.1111/ctr.14785.
  57. Stites, E.; Kumar, D.; Olaitan, O.; John Swanson, S.; Leca, N.; Weir, M.; Bromberg, J.; Melancon, J.; Agha, I.; Fattah, H.; et al. High Levels of Dd-cfDNA Identify Patients with TCMR 1A and Borderline Allograft Rejection at Elevated Risk of Graft Injury. *American Journal of Transplantation* **2020**, *20*, 2491–2498, doi:10.1111/ajt.15822.
  58. Chen, X.-T.; Chen, W.-F.; Li, J.; Deng, R.-H.; Huang, Y.; Yang, S.-C.; Chen, P.-S.; Jiang, T.-Y.; Liu, H.-T.; Wang, C.-X.; et al. Urine Donor-Derived Cell-Free DNA Helps Discriminate BK Polyomavirus-Associated Nephropathy in Kidney Transplant Recipients With BK Polyomavirus Infection. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1763, doi:10.3389/fimmu.2020.01763.
  59. Goussous, N.; Xie, W.; Dawany, N.; Scalea, J.R.; Bartosic, A.; Haririan, A.; Kalil, R.; Drachenberg, C.; Costa, N.; Weir, M.R.; et al. Donor-

- Derived Cell-Free DNA in Infections in Kidney Transplant Recipients: Case Series. *Transplantation Direct* **2020**, *6*, e568, doi:10.1097/TXD.0000000000001019.
60. Roedder, S.; Sigdel, T.; Salomonis, N.; Hsieh, S.; Dai, H.; Bestard, O.; Metes, D.; Zeevi, A.; Gritsch, A.; Cheeseman, J.; et al. The kSORT Assay to Detect Renal Transplant Patients at High Risk for Acute Rejection: Results of the Multicenter AART Study. *PLoS Med* **2014**, *11*, e1001759, doi:10.1371/journal.pmed.1001759.
  61. Li, B.; Hartono, C.; Ding, R.; Sharma, V.K.; Ramaswamy, R.; Qian, B.; Serur, D.; Mouradian, J.; Schwartz, J.E.; Suthanthiran, M. Noninvasive Diagnosis of Renal-Allograft Rejection by Measurement of Messenger RNA for Perforin and Granzyme B in Urine. *N Engl J Med* **2001**, *344*, 947–954, doi:10.1056/NEJM200103293441301.
  62. Lee, I.; Wang, L.; Wells, A.D.; Dorf, M.E.; Ozkaynak, E.; Hancock, W.W. Recruitment of Foxp3<sup>+</sup> T Regulatory Cells Mediating Allograft Tolerance Depends on the CCR4 Chemokine Receptor. *The Journal of Experimental Medicine* **2005**, *201*, 1037–1044, doi:10.1084/jem.20041709.
  63. Muthukumar, T.; Dadhania, D.; Ding, R.; Snopkowski, C.; Naqvi, R.; Lee, J.B.; Hartono, C.; Li, B.; Sharma, V.K.; Seshan, S.V.; et al. Messenger RNA for *FOXP3* in the Urine of Renal-Allograft Recipients. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 2342–2351, doi:10.1056/NEJMoa051907.
  64. Ho, J.; Schaub, S.; Wiebe, C.; Gao, A.; Wehmeier, C.; Koller, M.T.; Hirsch, H.H.; Hopfer, H.; Nickerson, P.; Hirt-Minkowski, P. Urinary CXCL10 Chemokine Is Associated With Alloimmune and Virus Compartment-Specific Renal Allograft Inflammation. *Transplantation* **2018**, *102*, 521–529, doi:10.1097/TP.0000000000001931.
  65. Zlotnik, A.; Yoshie, O. Chemokines. *Immunity* **2000**, *12*, 121–127, doi:10.1016/S1074-7613(00)80165-X.
  66. Murphy, P.M.; Baggiolini, M.; Charo, I.F.; Hébert, C.A.; Horuk, R.; Matsushima, K.; Miller, L.H.; Oppenheim, J.J.; Power, C.A. International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev* **2000**, *52*, 145–176.
  67. Miller, M.; Mayo, K. Chemokines from a Structural Perspective. *IJMS* **2017**, *18*, 2088, doi:10.3390/ijms18102088.
  68. Kufareva, I.; Salanga, C.L.; Handel, T.M. Chemokine and Chemokine Receptor Structure and Interactions: Implications for Therapeutic Strategies. *Immunol Cell Biol* **2015**, *93*, 372–383, doi:10.1038/icb.2015.15.

69. Hutchinson, E.G.; Thornton, J.M. The Greek Key Motif: Extraction, Classification and Analysis. *Protein Eng Des Sel* **1993**, *6*, 233–245, doi:10.1093/protein/6.3.233.
70. Lekan, A.A.; Weiner, L.M. The Role of Chemokines in Orchestrating the Immune Response to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* **2024**, *16*, 559, doi:10.3390/cancers16030559.
71. Millán, O.; Budde, K.; Sommerer, C.; Aliart, I.; Rissling, O.; Bardaji, B.; Matz, M.; Zeier, M.; Silva, I.; Guirado, L.; et al. Urinary miR-155-5p and CXCL10 as Prognostic and Predictive Biomarkers of Rejection, Graft Outcome and Treatment Response in Kidney Transplantation. *Brit J Clinical Pharma* **2017**, *83*, 2636–2650, doi:10.1111/bcp.13399.
72. Mühlbacher, J.; Doberer, K.; Kozakowski, N.; Regele, H.; Camovic, S.; Haindl, S.; Bond, G.; Haslacher, H.; Eskandary, F.; Reeve, J.; et al. Non-Invasive Chemokine Detection: Improved Prediction of Antibody-Mediated Rejection in Donor-Specific Antibody-Positive Renal Allograft Recipients. *Front. Med.* **2020**, *7*, 114, doi:10.3389/fmed.2020.00114.
73. Lasagni, L.; Francalanci, M.; Annunziato, F.; Lazzeri, E.; Giannini, S.; Cosmi, L.; Sagrinati, C.; Mazzinghi, B.; Orlando, C.; Maggi, E.; et al. An Alternatively Spliced Variant of CXCR3 Mediates the Inhibition of Endothelial Cell Growth Induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and Acts as Functional Receptor for Platelet Factor 4. *The Journal of Experimental Medicine* **2003**, *197*, 1537–1549, doi:10.1084/jem.20021897.
74. García-López, M.Á.; Sánchez-Madrid, F.; Rodríguez-Frade, J.M.; Mellado, M.; Acevedo, A.; García, M.I.; Albar, J.P.; Martínez-A, C.; Marazuela, M. CXCR3 Chemokine Receptor Distribution in Normal and Inflamed Tissues: Expression on Activated Lymphocytes, Endothelial Cells, and Dendritic Cells. *Laboratory Investigation* **2001**, *81*, 409–418, doi:10.1038/labinvest.3780248.
75. Loetscher, M.; Loetscher, P.; Brass, N.; Meese, E.; Moser, B. Lymphocyte-Specific Chemokine Receptor CXCR3: Regulation, Chemokine Binding and Gene Localization. *Eur J Immunol* **1998**, *28*, 3696–3705, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3696::AID-IMMU3696>3.0.CO;2-W.
76. Karin, N.; Razon, H. Chemokines beyond Chemo-Attraction: CXCL10 and Its Significant Role in Cancer and Autoimmunity. *Cytokine* **2018**, *109*, 24–28, doi:10.1016/j.cyto.2018.02.012.
77. Zare-Bidaki, M.; Karimi-Googheri, M.; Hassanshahi, G.; Zainodini, N.; Arababadi, M.K. The Frequency of CCR5 Promoter Polymorphisms and

- CCR5  $\Delta$  32 Mutation in Iranian Populations. *Iran J Basic Med Sci* **2015**, *18*, 312–316.
78. Janes, S. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*; 2nd ed.; Elsevier Science & Technology: San Diego, 2021; ISBN 978-0-08-102724-0.
  79. Barker, C.E.; Ali, S.; O'Boyle, G.; Kirby, J.A. Transplantation and Inflammation: Implications for the Modification of Chemokine Function. *Immunology* **2014**, *143*, 138–145, doi:10.1111/imm.12332.
  80. Fahmy, N.M.; Yamani, M.H.; Starling, R.C.; Ratliff, N.B.; Young, J.B.; McCarthy, P.M.; Feng, J.; Novick, A.C.; Fairchild, R.L. Chemokine and Receptor-Gene Expression during Early and Late Acute Rejection Episodes in Human Cardiac Allografts. *Transplantation* **2003**, *75*, 2044–2047, doi:10.1097/01.TP.0000069601.73079.94.
  81. Fahmy, N.M.; Yamani, M.H.; Starling, R.C.; Ratliff, N.B.; Young, J.B.; McCarthy, P.M.; Feng, J.; Novick, A.C.; Fairchild, R.L. Chemokine and Chemokine Receptor Gene Expression Indicates Acute Rejection of Human Cardiac Transplants. *Transplantation* **2003**, *75*, 72–78, doi:10.1097/00007890-200301150-00013.
  82. Hirt-Minkowski, P.; Amico, P.; Ho, J.; Gao, A.; Bestland, J.; Hopfer, H.; Steiger, J.; Dickenmann, M.; Burkhalter, F.; Rush, D.; et al. Detection of Clinical and Subclinical Tubulo-Interstitial Inflammation by the Urinary CXCL10 Chemokine in a Real-Life Setting. *Am J Transplant* **2012**, *12*, 1811–1823, doi:10.1111/j.1600-6143.2012.03999.x.
  83. Schaub, S.; Nickerson, P.; Rush, D.; Mayr, M.; Hess, C.; Golian, M.; Stefura, W.; HayGlass, K. Urinary CXCL9 and CXCL10 Levels Correlate with the Extent of Subclinical Tubulitis. *American Journal of Transplantation* **2009**, *9*, 1347–1353, doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02645.x.
  84. Jackson, J.A.; Kim, E.J.; Begley, B.; Cheeseman, J.; Harden, T.; Perez, S.D.; Thomas, S.; Warshaw, B.; Kirk, A.D. Urinary Chemokines CXCL9 and CXCL10 Are Noninvasive Markers of Renal Allograft Rejection and BK Viral Infection. *Am J Transplant* **2011**, *11*, 2228–2234, doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03680.x.
  85. Rabant, M.; Amrouche, L.; Lebreton, X.; Aulagnon, F.; Benon, A.; Sauvaget, V.; Bonifay, R.; Morin, L.; Scemla, A.; Delville, M.; et al. Urinary C-X-C Motif Chemokine 10 Independently Improves the Noninvasive Diagnosis of Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection. *J Am Soc Nephrol* **2015**, *26*, 2840–2851, doi:10.1681/ASN.2014080797.

86. Piemonti, L.; Sordi, V.; Pellegrini, S.; Scotti, G.M.; Scavini, M.; Sioli, V.; Gianelli Castiglione, A.; Cardillo, M. Circulating CXCL10 and IL-6 in Solid Organ Donors after Brain Death Predict Graft Outcomes. *Sci Rep* **2021**, *11*, 6624, doi:10.1038/s41598-021-86085-6.
87. Maslauskienė, R.; Vaiciuniene, R.; Tretjakovs, P.; Gersone, G.; Radzeviciene, A.; Bura, A.; Stankevicius, E.; Bumblyte, I.A. Deceased Kidney Donor Biomarkers: Relationship between Delayed Kidney Function and Graft Function Three Years after Transplantation. *Diagnostics (Basel)* **2024**, *14*, 717, doi:10.3390/diagnostics14070717.
88. Blydt-Hansen, T.D.; Sharma, A.; Gibson, I.W.; Wiebe, C.; Sharma, A.P.; Langlois, V.; Teoh, C.W.; Rush, D.; Nickerson, P.; Wishart, D.; et al. Validity and Utility of Urinary CXCL10/Cr Immune Monitoring in Pediatric Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* **2021**, *21*, 1545–1555, doi:10.1111/ajt.16336.
89. Rabant, M.; Amrouche, L.; Morin, L.; Bonifay, R.; Lebreton, X.; Aouni, L.; Benon, A.; Sauvaget, V.; Le Vaillant, L.; Aulagnon, F.; et al. Early Low Urinary CXCL9 and CXCL10 Might Predict Immunological Quiescence in Clinically and Histologically Stable Kidney Recipients. *Am J Transplant* **2016**, *16*, 1868–1881, doi:10.1111/ajt.13677.
90. Lazzeri, E.; Rotondi, M.; Mazzinghi, B.; Lasagni, L.; Buonamano, A.; Rosati, A.; Pradella, F.; Fossombroni, V.; La Villa, G.; Gacci, M.; et al. High CXCL10 Expression in Rejected Kidneys and Predictive Role of Pretransplant Serum CXCL10 for Acute Rejection And Chronic Allograft Nephropathy: *Transplantation* **2005**, *79*, 1215–1220, doi:10.1097/01.TP.0000160759.85080.2E.
91. Heidt, S.; Shankar, S.; Muthusamy, A.S.R.; San Segundo, D.; Wood, K.J. Pretransplant Serum CXCL9 and CXCL10 Levels Fail to Predict Acute Rejection in Kidney Transplant Recipients Receiving Induction Therapy. *Transplantation* **2011**, *91*, e59–e61, doi:10.1097/TP.0b013e318210de6b.
92. Jackson, J.A.; Kim, E.J.; Begley, B.; Cheeseman, J.; Harden, T.; Perez, S.D.; Thomas, S.; Warshaw, B.; Kirk, A.D. Urinary Chemokines CXCL9 and CXCL10 Are Noninvasive Markers of Renal Allograft Rejection and BK Viral Infection. *American Journal of Transplantation* **2011**, *11*, 2228–2234, doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03680.x.
93. Tinel, C.; Devresse, A.; Vermorel, A.; Sauvaget, V.; Marx, D.; Avettand-Fenoel, V.; Amrouche, L.; Timsit, M.-O.; Snanoudj, R.; Caillard, S.; et al. Development and Validation of an Optimized Integrative Model Using Urinary Chemokines for Noninvasive

- Diagnosis of Acute Allograft Rejection. *American Journal of Transplantation* **2020**, 20, 3462–3476, doi:10.1111/ajt.15959.
94. Millán, O.; Rovira, J.; Guirado, L.; Espinosa, C.; Budde, K.; Sommerer, C.; Piñeiro, G.J.; Diekmann, F.; Brunet, M. Advantages of Plasmatic CXCL-10 as a Prognostic and Diagnostic Biomarker for the Risk of Rejection and Subclinical Rejection in Kidney Transplantation. *Clinical Immunology* **2021**, 229, 108792, doi:10.1016/j.clim.2021.108792.
  95. Rotondi, M.; Netti, G.S.; Lazzeri, E.; Stallone, G.; Bertonni, E.; Chiovato, L.; Grandaliano, G.; Gesualdo, L.; Salvadori, M.; Schena, F.P.; et al. High Pretransplant Serum Levels of CXCL9 Are Associated with Increased Risk of Acute Rejection and Graft Failure in Kidney Graft Recipients. *Transpl Int* **2010**, 23, 465–475, doi:10.1111/j.1432-2277.2009.01006.x.
  96. Hricik, D.E.; Nickerson, P.; Formica, R.N.; Poggio, E.D.; Rush, D.; Newell, K.A.; Goebel, J.; Gibson, I.W.; Fairchild, R.L.; Riggs, M.; et al. Multicenter Validation of Urinary CXCL9 as a Risk-Stratifying Biomarker for Kidney Transplant Injury. *Am J Transplant* **2013**, 13, 2634–2644, doi:10.1111/ajt.12426.
  97. Hirt-Minkowski, P.; Ho, J.; Gao, A.; Amico, P.; Koller, M.T.; Hopfer, H.; Rush, D.N.; Nickerson, P.W.; Schaub, S. Prediction of Long-Term Renal Allograft Outcome By Early Urinary CXCL10 Chemokine Levels. *Transplantation Direct* **2015**, 1, e31, doi:10.1097/TXD.0000000000000537.
  98. Raza, A.; Firasat, S.; Khaliq, S.; Aziz, T.; Mubarak, M.; Naqvi, S.A.A.; Mehdi, S.Q.; Rizvi, S.A.-U.-H.; Abid, A. The Association of Urinary Interferon-Gamma Inducible Protein-10 (IP10/CXCL10) Levels with Kidney Allograft Rejection. *Inflamm Res* **2017**, 66, 425–432, doi:10.1007/s00011-017-1025-7.
  99. Faddoul, G.; Nadkarni, G.N.; Bridges, N.D.; Goebel, J.; Hricik, D.E.; Formica, R.; Menon, M.C.; Morrison, Y.; Murphy, B.; Newell, K.; et al. Analysis of Biomarkers Within the Initial 2 Years Posttransplant and 5-Year Kidney Transplant Outcomes: Results From Clinical Trials in Organ Transplantation-17. *Transplantation* **2018**, 102, 673–680, doi:10.1097/TP.0000000000002026.
  100. Ciftci, H.S.; Tefik, T.; Savran, M.K.; Demir, E.; Caliskan, Y.; Ogret, Y.D.; Oktar, T.; Sanlı, O.; Kocak, T.; Ozluk, Y.; et al. Urinary CXCL9 and CXCL10 Levels and Acute Renal Graft Rejection. *Int J Organ Transplant Med* **2019**, 10, 53–63.
  101. Weseslindtner, L.; Hedman, L.; Wang, Y.; Strassl, R.; Helanterä, I.; Aberle, S.W.; Bond, G.; Hedman, K. Longitudinal Assessment of the

- CXCL10 Blood and Urine Concentration in Kidney Transplant Recipients with BK Polyomavirus Replication-a Retrospective Study. *Transpl Int* **2020**, *33*, 555–566, doi:10.1111/tri.13584.
102. Yan, L.; Li, Y.-M.; Li, Y.; Bai, Y.-J.; Wan, Z.-L.; Fan, J.-W.; Luo, L.-M.; Wang, L.-L.; Shi, Y.-Y. Role of Serum CXCL9 and CXCL13 in Predicting Infection after Kidney Transplant: A STROBE Study. *Medicine* **2021**, *100*, e24762, doi:10.1097/MD.00000000000024762.
  103. Arnau, A.; Benito-Hernández, A.; Ramos-Barrón, M.A.; García-Unzueta, M.T.; Gómez-Román, J.J.; Gómez-Ortega, J.M.; López-Hoyos, M.; San Segundo, D.; Ruiz, J.C.; Rodrigo, E. Urinary C-X-C Motif Chemokine 10 Is Related to Acute Graft Lesions Secondary to T Cell- and Antibody-Mediated Damage. *Ann Transplant* **2021**, *26*, e929491, doi:10.12659/AOT.929491.
  104. San Segundo, D.; Guiral-Foz, S.A.; Benito-Hernández, A.; Fernández, A.R.; Arnau, A.; Valero, R.; Ramos-Barrón, M.A.; García-Unzueta, M.T.; Gómez-Ortega, J.M.; López-Hoyos, M.; et al. Urinary CXCL10 Specifically Relates to HLA-DQ Eplet Mismatch Load in Kidney Transplant Recipients. *Transpl Immunol* **2022**, *70*, 101494, doi:10.1016/j.trim.2021.101494.
  105. Moledina, D.G.; Obeid, W.; Smith, R.N.; Rosales, I.; Sise, M.E.; Moeckel, G.; Kashgarian, M.; Kuperman, M.; Campbell, K.N.; Lefferts, S.; et al. Identification and Validation of Urinary CXCL9 as a Biomarker for Diagnosis of Acute Interstitial Nephritis. *J Clin Invest* **2023**, *133*, e168950, doi:10.1172/JCI168950.
  106. van Duijl, T.T.; de Rooij, E.N.M.; Treep, M.M.; Koelemaij, M.E.; Romijn, F.P.H.T.M.; Hoogeveen, E.K.; Ruhaak, L.R.; le Cessie, S.; de Fijter, J.W.; Cobbaert, C.M. Urinary Kidney Injury Biomarkers Are Associated with Ischemia-Reperfusion Injury Severity in Kidney Allograft Recipients. *Clin Chem* **2023**, *69*, 924–935, doi:10.1093/clinchem/hvad086.
  107. Haller, J.; Diebold, M.; Leuzinger, K.; Wehmeier, C.; Handschin, J.; Amico, P.; Hirt-Minkowski, P.; Steiger, J.; Dickenmann, M.; Hirsch, H.H.; et al. Urine CXCL10 to Assess BK Polyomavirus Replication After Kidney Transplantation. *Transplantation* **2023**, doi:10.1097/TP.0000000000004712.
  108. Hirt-Minkowski, P.; Handschin, J.; Stampf, S.; Hopfer, H.; Menter, T.; Senn, L.; Hönger, G.; Wehmeier, C.; Amico, P.; Steiger, J.; et al. Randomized Trial to Assess the Clinical Utility of Renal Allograft Monitoring by Urine CXCL10 Chemokine. *J Am Soc Nephrol* **2023**, *34*, 1456–1469, doi:10.1681/ASN.0000000000000160.

109. Van Loon, E.; Tinel, C.; De Loor, H.; Bossuyt, X.; Callemeyn, J.; Coemans, M.; De Vusser, K.; Sauvaget, V.; Olivre, J.; Koshy, P.; et al. Automated Urinary Chemokine Assays for Noninvasive Detection of Kidney Transplant Rejection: A Prospective Cohort Study. *American Journal of Kidney Diseases* **2024**, *83*, 467–476, doi:10.1053/j.ajkd.2023.07.022.
110. Barrett-Chan, E.; Wang, L.; Bone, J.; Thachil, A.; Vytlingam, K.; Blydt-Hansen, T. Optimizing the Approach to Monitoring Allograft Inflammation Using Serial Urinary CXCL10/Creatinine Testing in Pediatric Kidney Transplant Recipients. *Pediatric Transplantation* **2024**, *28*, e14718, doi:10.1111/petr.14718.
111. Helle, F.; Brochot, E.; Handala, L.; Martin, E.; Castelain, S.; Francois, C.; Duverlie, G. Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses* **2017**, *9*, 327, doi:10.3390/v9110327.
112. Knowles, W.A.; Pipkin, P.; Andrews, N.; Vyse, A.; Minor, P.; Brown, D.W.G.; Miller, E. Population-based Study of Antibody to the Human Polyomaviruses BKV and JCV and the Simian Polyomavirus SV40. *Journal of Medical Virology* **2003**, *71*, 115–123, doi:10.1002/jmv.10450.
113. Kant, S.; Dasgupta, A.; Bagnasco, S.; Brennan, D.C. BK Virus Nephropathy in Kidney Transplantation: A State-of-the-Art Review. *Viruses* **2022**, *14*, 1616, doi:10.3390/v14081616.
114. Drachenberg, C.B.; Papadimitriou, J.C. Polyomavirus-associated Nephropathy: Update in Diagnosis. *Transplant Infectious Dis* **2006**, *8*, 68–75, doi:10.1111/j.1399-3062.2006.00154.x.
115. Hedayat, K.M. The Theory of Endobiogeny: Biological Modeling Using Downstream Physiologic Output as Inference of Upstream Global System Regulation. *J., complex., health sci.* **2020**, *3*, 1–8, doi:10.21595/chs.2020.21072.
116. Lapraz, J.-C.; Hedayat, K.M.; Pauly, P. Endobiogeny: A Global Approach to Systems Biology (Part 2 of 2). *Glob Adv Health Med* **2013**, *2*, 32–44, doi:10.7453/gahmj.2013.013.
117. Braukyliene, R.; Hedayat, K.; Zajanckauskiene, L.; Jurenas, M.; Unikas, R.; Aldujeli, A.; Petrokas, O.; Zabiela, V.; Steponaviciute, R.; Vitkauskiene, A.; et al. Prognostic Value of Cortisol Index of Endobiogeny in Acute Myocardial Infarction Patients. *Medicina* **2021**, *57*, 602, doi:10.3390/medicina57060602.
118. Hedayat, K.M.; Lapraz, J.-C. *The Theory of Endobiogeny. Volume 1, Global Systems Thinking and Biological Modeling for Clinical*

- Medicine*; First edition.; Academic Press: London, 2019; ISBN 978-0-12-817326-8.
119. Kamyar Hedayat; Benjamin M Shuff; Jean-Claude Lapraz; Tiffany Barsotti; Shahrokh Golshan; Suzi Hong; Barry Greenberg; Paul J Mills Genito-Thyroid Index: A Global Systems Approach to the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio According to the Theory of Endobiogeny Applied to Ambulatory Patients with Chronic Heart Failure. *J Cardiol Clin Res* **2017**.
  120. Duraffourd, C.; Alliot, F.; Dal Gobbo, B. *Endobiogénie et plante médicinale: du sens en physiologie à la pratique en phytothérapie*; Elsevier-Masson: Issy-les-Moulineaux, 2020; ISBN 978-2-294-76846-0.
  121. ĮSAKYMAS DĖL LIETUVOS RESPUBLIKOS SVEIKATOS APSAUGOS MINISTRO 2020 M. SPALIO 6 D. ĮSAKYMO NR. V-2199 „DĖL PAPILDOMOSIOS IR ALTERNATYVIOSIOS SVEIKATOS PRIEŽIŪROS SRIČIŲ PASLAUGŲ GRUPĖMS IR (AR) POGRUPIAMS PRISKIRIAMŲ KONKREČIŲ PASLAUGŲ SĄRAŠO IR JO SUDARYMO TVARKOS APRAŠO PATVIRTINIMO“ PAKEITIMO 2021.
  122. Drachenberg, C.B.; Papadimitriou, J.C.; Chaudhry, M.R.; Ugarte, R.; Mavanur, M.; Thomas, B.; Cangro, C.; Costa, N.; Ramos, E.; Weir, M.R.; et al. Histological Evolution of BK Virus–Associated Nephropathy: Importance of Integrating Clinical and Pathological Findings. *American Journal of Transplantation* **2017**, *17*, 2078–2091, doi:10.1111/ajt.14314.
  123. Loupy, A.; Hill, G.S.; Jordan, S.C. The Impact of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies on Late Kidney Allograft Failure. *Nat Rev Nephrol* **2012**, *8*, 348–357, doi:10.1038/nrneph.2012.81.
  124. Michael, P. *Treating Digestive Disorders with Endobiogenic Medicine an Innovative System of Plant Healing*; Aeon Books: London, 2021; ISBN 978-1-912807-46-8.
  125. Arnau, A.; Benito-Hernández, A.; Ramos-Barrón, M.A.; García-Unzueta, M.T.; Gómez-Román, J.J.; Gómez-Ortega, J.M.; López-Hoyos, M.; San Segundo, D.; Ruiz, J.C.; Rodrigo, E. Urinary C-X-C Motif Chemokine 10 Is Related to Acute Graft Lesions Secondary to T Cell- and Antibody-Mediated Damage. *Ann Transplant* **2021**, *26*, doi:10.12659/AOT.929491.
  126. Ho, J.; Sharma, A.; Mandal, R.; Wishart, D.S.; Wiebe, C.; Storsley, L.; Karpinski, M.; Gibson, I.W.; Nickerson, P.W.; Rush, D.N. Detecting Renal Allograft Inflammation Using Quantitative Urine Metabolomics

- and CXCL10. *Transplantation Direct* **2016**, *2*, e78, doi:10.1097/TXD.0000000000000589.
127. Rodriguez-Ramirez, S.; Al Jurdi, A.; Konvalinka, A.; Riella, L.V. Antibody-Mediated Rejection: Prevention, Monitoring and Treatment Dilemmas. *Curr Opin Organ Transplant* **2022**, *27*, 405–414, doi:10.1097/MOT.0000000000001011.
  128. Alasfar, S.; Kodali, L.; Schinstock, C.A. Current Therapies in Kidney Transplant Rejection. *JCM* **2023**, *12*, 4927, doi:10.3390/jcm12154927.
  129. Gao, J.; Wu, L.; Zhao, Y.; Hong, Q.; Feng, Z.; Chen, X. Cxcl10 Deficiency Attenuates Renal Interstitial Fibrosis through Regulating Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Exp Cell Res* **2022**, *410*, 112965, doi:10.1016/j.yexcr.2021.112965.
  130. Matz, M.; Beyer, J.; Wunsch, D.; Mashreghi, M.-F.; Seiler, M.; Pratschke, J.; Babel, N.; Volk, H.-D.; Reinke, P.; Kotsch, K. Early Post-Transplant Urinary IP-10 Expression after Kidney Transplantation Is Predictive of Short- and Long-Term Graft Function. *Kidney International* **2006**, *69*, 1683–1690, doi:10.1038/sj.ki.5000343.
  131. De Buck, M.; Gouwy, M.; Wang, J.M.; Van Snick, J.; Proost, P.; Struyf, S.; Van Damme, J. The Cytokine-Serum Amyloid A-Chemokine Network. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2016**, *30*, 55–69, doi:10.1016/j.cytogfr.2015.12.010.
  132. Genest, D.S.; Patriquin, C.J.; Licht, C.; John, R.; Reich, H.N. Renal Thrombotic Microangiopathy: A Review. *Am J Kidney Dis* **2023**, *81*, 591–605, doi:10.1053/j.ajkd.2022.10.014.
  133. Ramos, M.V.; Ruggieri, M.; Panek, A.C.; Mejias, M.P.; Fernandez-Brando, R.J.; Abrey-Recalde, M.J.; Exeni, A.; Barilari, C.; Exeni, R.; Palermo, M.S. Association of Haemolytic Uraemic Syndrome with Dysregulation of Chemokine Receptor Expression in Circulating Monocytes. *Clinical Science* **2015**, *129*, 235–244, doi:10.1042/CS20150016.
  134. Gu, D.; Chen, Z.; Zhao, H.; Du, W.; Xue, F.; Ge, J.; Sui, T.; Wu, H.; Liu, B.; Lu, S.; et al. Th1 (CXCL10) and Th2 (CCL2) Chemokine Expression in Patients with Immune Thrombocytopenia. *Human Immunology* **2010**, *71*, 586–591, doi:10.1016/j.humimm.2010.02.010.
  135. Knoppova, B.; Reily, C.; King, R.G.; Julian, B.A.; Novak, J.; Green, T.J. Pathogenesis of IgA Nephropathy: Current Understanding and Implications for Development of Disease-Specific Treatment. *J Clin Med* **2021**, *10*, 4501, doi:10.3390/jcm10194501.
  136. Kung, V.L.; Avasare, R.; Friedman, M.A.; Koon, S.M.; Neff, T.L.; Protzek, S.; Corless, C.; Krajchich, V.; Setthavongsack, N.; Dittmore, R.;

- et al. Targeted Transcriptional Analysis of IgA Vasculitis, IgA Nephropathy, and IgA-Dominant Infection-Related Glomerulonephritis Reveals Both Distinct and Overlapping Immune Signatures. *Kidney360* **2023**, *4*, e759–e768, doi:10.34067/KID.0000000000000123.
137. Ortega, H.; Llanos, J.-P.; Lafeuille, M.-H.; Duh, M.S.; Germain, G.; Lejeune, D.; Sama, S.; Bell, C.; Hahn, B. Effects of Systemic Corticosteroids on Blood Eosinophil Counts in Asthma: Real-World Data. *Journal of Asthma* **2019**, *56*, 808–815, doi:10.1080/02770903.2018.1502301.
  138. Almirall, J.; Campistol, J.M.; Sole, M.; Andreu, J.; Revert, L. Blood and Graft Eosinophilia as a Rejection Index in Kidney Transplant. *Nephron* **1993**, *65*, 304–309, doi:10.1159/000187493.
  139. Lautenschlager, I.; Willebrand, E.V.; Häyry, P. BLOOD EOSINOPHILIA, STEROIDS, AND REJECTION: *Transplantation* **1985**, *40*, 354–356, doi:10.1097/00007890-198510000-00003.
  140. Kandikattu, H.K.; Venkateshaiah, S.U.; Verma, A.K.; Mishra, A. Tacrolimus (FK506) Treatment Protects Allergen-, IL-5- and IL-13-induced Mucosal Eosinophilia. *Immunology* **2021**, *163*, 220–235, doi:10.1111/imm.13314.
  141. Kannegieter, N.M.; Hesselink, D.A.; Dieterich, M.; Kraaijeveld, R.; Rowshani, A.T.; Leenen, P.J.M.; Baan, C.C. The Effect of Tacrolimus and Mycophenolic Acid on CD14+ Monocyte Activation and Function. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170806, doi:10.1371/journal.pone.0170806.
  142. Vereyken, E.J.F.; Kraaij, M.D.; Baan, C.C.; Rezaee, F.; Weimar, W.; Wood, K.J.; Leenen, P.J.M.; Rowshani, A.T. A Shift towards Pro-Inflammatory CD16+ Monocyte Subsets with Preserved Cytokine Production Potential after Kidney Transplantation. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70152, doi:10.1371/journal.pone.0070152.
  143. Xing, Y.; Edwards, M.A.; Ahlem, C.; Kennedy, M.; Cohen, A.; Gomez-Sanchez, C.E.; Rainey, W.E. The Effects of ACTH on Steroid Metabolomic Profiles in Human Adrenal Cells. *Journal of Endocrinology* **2011**, *209*, 327–335, doi:10.1530/JOE-10-0493.
  144. Park, Y.M.; Bochner, B.S. Eosinophil Survival and Apoptosis in Health and Disease. *Allergy Asthma Immunol Res* **2010**, *2*, 87–101, doi:10.4168/aaair.2010.2.2.87.
  145. Lee, Y.; Yi, H.-S.; Kim, H.R.; Joung, K.H.; Kang, Y.E.; Lee, J.H.; Kim, K.S.; Kim, H.J.; Ku, B.J.; Shong, M. The Eosinophil Count Tends to Be Negatively Associated with Levels of Serum Glucose in Patients with Adrenal Cushing Syndrome. *Endocrinol Metab* **2017**, *32*, 353, doi:10.3803/EnM.2017.32.3.353.

146. Abildgaard, J.; Tingstedt, J.; Zhao, Y.; Hartling, H.J.; Pedersen, A.T.; Lindegaard, B.; Dam Nielsen, S. Increased Systemic Inflammation and Altered Distribution of T-Cell Subsets in Postmenopausal Women. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0235174, doi:10.1371/journal.pone.0235174.
147. Robinson, L.J.; Tourkova, I.; Wang, Y.; Sharrow, A.C.; Landau, M.S.; Yaroslavskiy, B.B.; Sun, L.; Zaidi, M.; Blair, H.C. FSH-Receptor Isoforms and FSH-Dependent Gene Transcription in Human Monocytes and Osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *394*, 12–17, doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.112.
148. Tomkins, M.; Martin-Grace, J.; Kennedy, C.; McEnroe, O.; Heverin, K.; Srinivasan, S.; Little, D.; Conlon, P.; De Freitas, D.; Denton, M.; et al. Adrenal Insufficiency Is Common amongst Kidney Transplant Recipients Receiving Maintenance Prednisolone and Can Be Predicted Using Morning Cortisol. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2023**, *38*, 236–245, doi:10.1093/ndt/gfac044.
149. Kim, J.M.; Song, R.K.; Kim, M.-J.; Lee, D.Y.; Jang, H.R.; Kwon, C.H.D.; Huh, W.S.; Kim, G.S.; Kim, S.J.; Choi, D.S.; et al. Hormonal Differences Between Female Kidney Transplant Recipients and Healthy Women With the Same Gynecologic Conditions. *Transplantation Proceedings* **2012**, *44*, 740–743, doi:10.1016/j.transproceed.2011.12.072.
150. Pietrzak, B.; Wielgos, M.; Kaminski, P.; Jabiry-Zieniewicz, Z.; Bobrowska, K. Menstrual Cycle and Sex Hormone Profile in Kidney-Transplanted Women. *Neuro Endocrinol Lett* **2006**, *27*, 198–202.
151. Kang, J.; Tian, J.; Lu, Y.; Song, Y.; Liu, X. Erectile Function after Kidney Transplantation: A Meta-Analysis. *Translational Andrology and Urology*; Vol 9, No 5 (October 29, 2020): *Translational Andrology and Urology* **2020**.
152. Salvadori, M.; Tsalouchos, A. Fertility and Pregnancy in End Stage Kidney Failure Patients and after Renal Transplantation: An Update. *Transplantology* **2021**, *2*, 92–108, doi:10.3390/transplantology2020010.
153. Dujardin, A.; Lorent, M.; Foucher, Y.; Legendre, C.; Kerleau, C.; Brouard, S.; Giral, M.; Blanco, G.; Branchereau, J.; Cantarovich, D.; et al. Time-Dependent Lymphocyte Count after Transplantation Is Associated with Higher Risk of Graft Failure and Death. *Kidney International* **2021**, *99*, 1189–1201, doi:10.1016/j.kint.2020.08.010.
154. Guillén-Gómez, E.; Guirado, L.; Belmonte, X.; Maderuelo, A.; Santín, S.; Juarez, C.; Ars, E.; Facundo, C.; Ballarín, J.A.; Vidal, S.; et al. Monocyte Implication in Renal Allograft Dysfunction. *Clin Exp Immunol* **2014**, *175*, 323–331, doi:10.1111/cei.12228.

155. Zhou, Q.; Shao, X.; Xu, L.; Zou, H.; Chen, W. Association between Monocyte-to-Lymphocyte Ratio and Inflammation in Chronic Kidney Disease: A Cross-Sectional Study. *Kidney Blood Press Res* **2024**, *49*, 1066–1074, doi:10.1159/000542625.
156. Liu, W.; Weng, S.; Cao, C.; Yi, Y.; Wu, Y.; Peng, D. Association between Monocyte-Lymphocyte Ratio and All-Cause and Cardiovascular Mortality in Patients with Chronic Kidney Diseases: A Data Analysis from National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2010. *Renal Failure* **2024**, *46*, 2352126, doi:10.1080/0886022X.2024.2352126.
157. Seiler, L.K.; Phung, N.L.; Nikolin, C.; Immenschuh, S.; Erck, C.; Kaufeld, J.; Haller, H.; Falk, C.S.; Jonczyk, R.; Lindner, P.; et al. An Antibody-Aptamer-Hybrid Lateral Flow Assay for Detection of CXCL9 in Antibody-Mediated Rejection after Kidney Transplantation. *Diagnostics (Basel)* **2022**, *12*, 308, doi:10.3390/diagnostics12020308.
158. Belperio, J.A.; Keane, M.P.; Burdick, M.D.; Lynch, J.P., III; Zisman, D.A.; Xue, Y.Y.; Li, K.; Ardehali, A.; Ross, D.J.; Strieter, R.M. Role of CXCL9/CXCR3 Chemokine Biology during Pathogenesis of Acute Lung Allograft Rejection 1. *The Journal of Immunology* **2003**, *171*, 4844–4852, doi:10.4049/jimmunol.171.9.4844.

## 10. SUMMARY

### ABBREVIATIONS

|           |                                                    |
|-----------|----------------------------------------------------|
| ABMR      | antibody mediated rejection                        |
| APC       | antigen presenting cells                           |
| BoF index | Biology of functions index                         |
| CRP       | C reactive protein                                 |
| CXCL      | chemokine                                          |
| dd-cfDNR  | donor-derived cell-free DNA                        |
| DNA       | deoxyribonucleic acid                              |
| DSA       | donor specific antibodies                          |
| EOS       | eosinophils                                        |
| ERY       | erythrocytes                                       |
| eGFG      | estimated glomerular filtration rate               |
| ESRD      | end stage renal disease                            |
| GTR       | genito-thyroid ratio                               |
| HD        | hemodialysis                                       |
| HgB       | hemoglobin                                         |
| IQR       | interquartile range                                |
| BMI       | body mass index                                    |
| diCBCi    | derived indices of complete blood count indicators |
| CNI       | calcineurin inhibitors                             |
| CKD       | chronic kidney disease                             |
| CXCL      | chemokine ligand                                   |
| HLA       | human leukocyte antigen                            |
| LEU       | leukocytes                                         |
| LYM       | lymphocytes                                        |
| LMI       | leukocyte mobilization index                       |
| OD        | optical density                                    |
| MON       | monocytes                                          |
| P         | statistical significance                           |
| CI        | confidence interval                                |
| PLT       | platelets                                          |
| PMI       | platelet mobilization index                        |
| SD        | standard deviation                                 |
| SE        | standard error                                     |
| OR        | odds ratio                                         |
| TCMR      | T cell mediated rejection                          |
| TRH       | thyreotropin releasing hormone                     |
| VUHSK     | Vilnius University Hospital Santaros Klinikos      |

## Introduction

Epidemiological studies show that CKD affects one in ten adults worldwide [1]. According to the data of 2019, in absolute numbers, the number of CKD patients worldwide amounted to more than 850 million people [2]. When ESRD is reached, renal replacement therapy such as dialysis or kidney transplantation is required. Between 3.0 and 27.8 kidney transplants per 1 million population are performed worldwide every year [3].

In order to prevent the kidney transplant from being rejected by the recipient's immune system, patients need to take immunosuppressive agents regularly. However, the average survival of a kidney transplant in different countries varies between 8 and 12 years when a kidney is transplanted from a deceased donor, and between 12 and 20 years when a kidney is transplanted from a living donor [5].

The most common cause of kidney transplant loss is allograft rejection; therefore, timely diagnosis and management of this entity is crucial so that to prolong the kidney transplant survival.

The diagnosis of renal transplant rejection is evolving towards non-invasive diagnostic methods to suspect or rule out renal transplant rejection in an early manner, to avoid unnecessary graft biopsy, or to help monitor the level of immunosuppression so that to adjust the administration of immunosuppressive drugs accordingly. Extensive work has already been done in the search for potential biomarkers of kidney transplant rejection in blood, urine, and kidney biopsy material, as well as by analyzing proteins, RNA and gene expression [47,54].

Among the potential biomarkers, chemokines are a feasible option. They can be detected in both blood and urine. Chemokines are chemotactic cytokines involved in various biological processes, such as angiogenesis, hematopoiesis, migration of leukocytes and other cells. The most promising chemokine biomarkers in kidney transplantation are *chemokine 9* (CXCL9) and *chemokine 10* (CXCL10).

CXCL9 (monokine induced by IFN- $\gamma$ ) and CXCL10 (IFN- $\gamma$ -inducible protein 10, IP-10) act through their shared receptor CXCR3 and have a potential to attract NK cells, mononuclear cells, specifically activated T cells, and B cells [158]. CXCL9 is a critical mediator of primed T cell trafficking in transplant models. In animal models, CXCL9 has also been shown to stimulate cytokine production by recruited T cells and promote Th1 cell proliferation through the induction of the transcription factors T-bet and ROR $\gamma$ T and the production of type-1 cytokines (IL-2, TNF, and IFN- $\gamma$ ) [74,75,78].

CXCL10 is constitutively expressed in stromal cells of lymphoid organs (spleen, thymus, and lymph nodes), thereby suggesting a potential role in T-cell development and effector functions [134]. CXCL10 is a biomarker for tubulointerstitial kidney allograft inflammation irrespective of the etiology, and it also tends to increase in antibody-mediated rejection with higher ‘g’, ‘ptc’ Banff scores [82]. In animal transplant models, both CXCL9 and CXCL10 levels rapidly rise following reperfusion and during early rejection of the liver, kidney, and heart [79–81].

## AIM OF THE STUDY

The aim of this study was to evaluate chemokines CXCL9 and CXCL10 as potential biomarkers of kidney transplant rejection and to investigate their relation to BoF indices.

## OBJECTIVES OF THE STUDY

- I. To evaluate the properties of urinary biomarkers CXCL9 and CXCL10 for the diagnosis of biopsy-proven kidney transplant rejection.
- II. To examine the association of CXCL9 and CXCL10 with individual histological lesions according to the Banff classification system.
- III. To evaluate the association of chemokines CXCL9 and CXCL10 to other kidney transplant pathologies (polyoma BK virus infection, recurrent glomerulonephritis).
- IV. To evaluate the influence of CXCL9 and CXCL10 on the prognosis of kidney transplant.
- V. To examine the relationship of derived indices with chemokines CXCL9 and CXCL10 and graft rejection.

## NOVELTY OF THE STUDY

This study examines the properties of chemokines CXCL9/kre and CXCL10/kre to diagnose kidney transplant rejection. Although a number of researches on this topic have already been published, and even though the urinary chemokine CXCL10 has been studied in more detail as a potential marker for the diagnosis of transplant rejection, while yet, there is less data on CXCL9 in the literature. In this work, both CXCL9 and CXCL10 markers were studied in the same cohort of patients. As a result,, so the work adds to the existing data by comparing the characteristics of both chemokines. What

is more, additional insights into the association of these markers to graft survival are provided.

A completely new and unexplored topic is investigated in one of the tasks of this work, specifically, - the connection of BoF indices (further named as derived indices of complete blood count indicators, further abbreviated as – diCBCi) with chemokines CXCL9 and CXCL10 and transplant rejection. According to our data To the best of the knowledge of the author of this thesis, so far, only a few articles have been published on the relationship of BoF indices with various pathologies, but these indices have never been examined in patients after kidney transplantation, nor are there any data available in academia on the association of BoF indices with urinary chemokines CXCL9 and CXCL10. Since the immunosuppression used by patients can have a significant influence on the values of the indices, the work provides valuable data which are bound to that change the interpretation of these indices specifically in the population of immunosuppressed patients.

## METHODOLOGY OF THE STUDY

### Research ethics

The study was conducted in accordance with the *Declaration of Helsinki*. To carry out this scientific work, *Vilnius Regional Bioethics Committee* provided an ethics vote No. 158200-17-901-409. All patients included in the study voluntarily agreed to participate in the biomedical study and signed the informed consent form.

### Research subjects

117 patients who underwent kidney allograft biopsy at the VULSK Nephrology Center were included in the biomedical study.

#### Patient inclusion criteria:

- age  $\geq 18$  years;
- a protocol or indicative biopsy of the transplanted kidney was performed.

#### Patient exclusion criteria:

- anuria;
- a urine sample not taken before the graft biopsy;
- non-informative histological sample of the transplanted kidney (no glomeruli in the sample, only medulla tissue taken).

The study participants who signed the informed consent form were given a container to collect a single mid-stream urine sample before the graft biopsy. After collection, the urine sample was aliquoted into smaller 3–10 ml tubes without additives, and the tubes were centrifuged, frozen and stored at -20°C.

### Chemokine detection

Urinary CXCL9 and CXCL10 measurements were performed retrospectively on midstream urine samples (collected before kidney biopsy and stored at -20 °C without any additives) with the *Human MIG (CXCL9) Mini ABTS ELISA Development Kit* (Peprotech, Catalog #900-M87) and the *Human IP-10 (CXCL10) Mini ABTS ELISA Development Kit* (Peprotech, Catalog #900-M39), respectively. All the procedures were carried out as recommended by the manufacturer while using the ELISA reagents provided within the *ABTS ELISA Buffer Kit* (Peprotech, Catalog #900-K00). Briefly, for the CXCL9 measurement, the ELISA plate wells were coated overnight at room temperature with 1 µg/mL *Rabbit Anti-Human MIG (CXCL9)* antibody, whereas, for the CXCL10 measurement, the wells were coated overnight at room temperature with 0.5 µg/mL *Rabbit Anti-Human IP-10 (CXCL10)* antibody, washed, and then blocked. Each urine sample (100 µL per well) and ELISA kit standards were tested in triplicate incubating for 2 h at room temperature. After washing, biotinylated *Rabbit Anti-Human MIG (CXCL9)* or *IP-10 (CXCL10)* secondary polyclonal antibody was added at 1 µg/mL or 0.25 µg/mL, respectively, and incubated for 2 h at room temperature. The plates were then washed, and incubated with avidin-horseradish peroxidase conjugate for 30 min at room temperature. After washing, the signal was developed with ABTS substrate by incubating for 25 min for CXCL9 detection, and for 20 min for CXCL10 detection. The optical density (OD) was read at 405 nm with a wavelength correction set at 650 nm by using a *Multiskan GO* spectrophotometer (Thermo Scientific). The CXCL9 and CXCL10 concentrations were calculated from standard curves by using the 4-parameter logistic model curve fit in the *OriginPro 8* (OriginLab) software. The detection ranges were 16–1000 pg/mL for both CXCL9 and CXCL10. Urine samples with measured ODs exceeding the OD of the 1000 pg/mL standards were diluted and retested. To correct for different urine dilutions, the excretion of urine proteins was normalized to urine creatinine (i.e., ng protein/mmol creatinine).

## Clinical data collection

The demographic and clinical data of the patients were collected, retrospectively, from the electronic medical history of VUHSC patients in the Eli database. The clinical and demographic data included the patients' age, gender, date of transplantation, the number of previous transplants, complete blood and biochemical blood tests, histological examination results, immunosuppression used, acquired infectious diseases, the start of dialysis, or the date of death. The clinical data were entered in *MS Excel* (Office 16, Microsoft) program and transferred to the *SPSS* (SPSS 29.0, Inc, Chicago, IL, USA) statistical program. A summary of the patients' clinical and demographic data is provided in Table 1.

**Table 1.** Clinical and demographic data of study participants

|                                         |                                             |                |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------|----------------|
| Gender                                  | Male, <i>n</i> (%)                          | 74 (63.2)      |
|                                         | Female, <i>n</i> %                          | 43 (36.8)      |
| Age                                     | Average age, years                          | 43 ± 13        |
| eGFR at biopsy *                        | mL/min/1.73 m <sup>2</sup>                  | 39 ± 18        |
| Biopsy time after transplantation       | Median months [IQR]                         | 20.0 [6–96]    |
| Number of transplantations              | First transplant: <i>n</i> (%) of patients  | 90 (76.9)      |
|                                         | Second transplant: <i>n</i> (%) of patients | 22 (18.8)      |
|                                         | Third transplant: <i>n</i> (%) of patients  | 5 (4.3)        |
| Total life years on immunosuppression   | Median [IQR]                                | 4.3 [1.0–11.0] |
| Hemoglobin at biopsy                    | g/L                                         | 115.8 ± 19.8   |
| BMI                                     | kg/m <sup>2</sup>                           | 24.7 ± 4.8     |
| Serum urea at biopsy                    | mmol/L                                      | 20.4 ± 12.6    |
| Biopsy result (% of cases)              | Normal histology, %                         | 22.2           |
|                                         | ABMR, %                                     | 21.4           |
|                                         | TCMR, %                                     | 7.7            |
|                                         | Mixed rejection, %                          | 8.8            |
|                                         | BK virus nephropathy, %                     | 4.4            |
|                                         | Other abnormalities, %                      | 35.9           |
| Immunosuppression                       | Tacrolimus, %                               | 66.7           |
|                                         | Cyclosporine, %                             | 25.6           |
|                                         | Mycophenolate, %                            | 93.2           |
|                                         | Methylprednisolone, %                       | 92.3           |
|                                         | Azathioprine, %                             | 2.6            |
|                                         | Sirolimus, %                                | 7.7            |
| Serum levels of immunosuppressive agent | Tacrolimus, ng/mL                           | 6.57 ± 3.78    |
|                                         | Cyclosporine, ng/mL (before dose)           | 84.74 ± 27.15  |
|                                         | Sirolimus, ng/mL                            | 0.83 ± 0.65    |

## Derived indices of complete blood count indicators

The derived indices of complete blood count indicators were calculated according to the formula used by the method of endobiogeny [115–119]. This method was created by the French doctor Christian Durauffourd in the 20<sup>th</sup> century [120]. His student Jean-Claude Lapraz patented an index system which evaluated the human endocrine system activity through the indicators of serum biochemistry and complete blood count (patent number US2016/0132655A1).

Endobiogeny is based on a principle that the organism has its congenital regulating mechanisms which aim to sustain the balance and optimal functioning. The regulating systems include the endocrine system (hormone regulation), the nervous system (regulation through neurotransmitters), and the immune system (immune response regulation).

In Lithuania, endobiogeny is classified as a group of biological effects services in the field of natural and folk medicine in the primary health care of a person, and its practitioners must have a license issued as an endobiogenic specialist [121].

When applying the endobiogenic method, not only an anamnesis, a physical examination of the patient, but also indices of functional biology are used to assess the patient's condition – these are indices calculated based on the indicators of general blood and some biochemical blood tests to be interpreted in the context of functional biology [116].

In this work, we used diCBCi calculated from the complete blood count test taken from patients on days 1–7 before the graft biopsy. The indices were named as they are called in the endobiogenic method; their names and formulas are presented in the results section.

## Statistical analysis

Quantitative variables were checked for normality by comparing medians and means, assessing coefficients of asymmetry and skewness, and visually reviewing histograms. If the variables followed a normal distribution, then we reported the mean and the standard deviation (SD), whereas, if the variables did not follow a normal distribution, we reported the median and the interquartile range [IQR]. For some variables which did not follow a normal distribution, a logarithmic transformation was applied for further analysis.

Qualitative variables are presented in frequencies. The data were assessed for outliers, by noting extreme values ( $<0.005$  and  $>0.995$  quintiles).

The Student t test (for normal distribution) and the Mann-Whitney U test (for non-normal distribution) were used to compare the two groups. When comparing more than two independent groups, the ANOVA or the Kruskal-Wallis test was used, depending on the distribution. When comparing proportions between two or more groups, chi-square was calculated.

Correlations between variables were assessed by calculating Pearson's correlation coefficients (for a normal distribution) or Spearman's correlation coefficients (for a non-normal distribution).

Hierarchical cluster analysis was performed to identify the associated histological parameters.

Logistic regression was used to assess the impact of markers on the diagnosis of kidney graft rejection.

The ability of biomarkers to distinguish graft rejection from any other pathology or normal histology was assessed by plotting ROC curves and calculating the area under the curve (AUC). The ROC curve was used to calculate the Youden index, to determine the threshold values of the biomarker, and to determine sensitivity and specificity.

The Kaplan-Meier methodology and Cox regression analysis were used to analyze graft survival. The log rank test was used to compare the survival of the groups, and the relationship of various factors (recipient gender, age, creatinine concentration, BMI, histological lesion data, chemokine concentration, derived indices) with the risk of loss of the graft function was evaluated by using the Cox regression method.

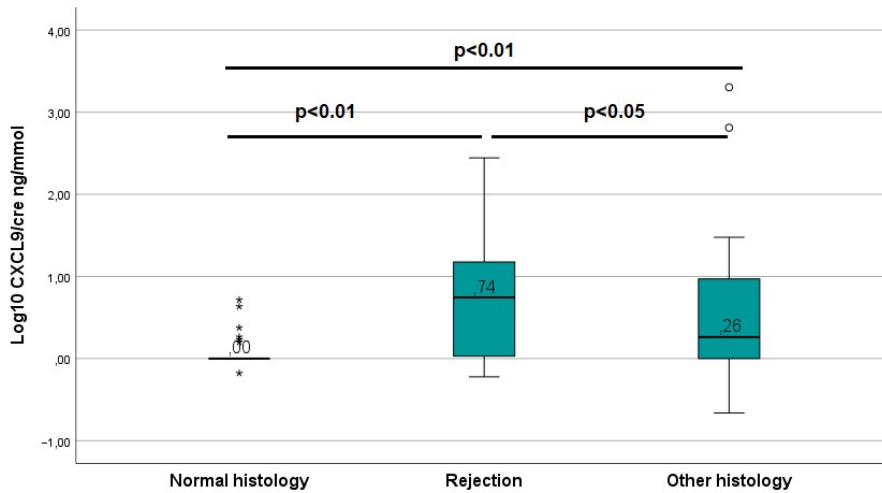
A P-value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical calculations were performed with *SPSS 29.0* (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

## RESULTS OF THE STUDY

### **I – Investigation of the properties of urinary biomarkers CXCL9 and CXCL10 for the diagnosis of biopsy-proven kidney transplant rejection**

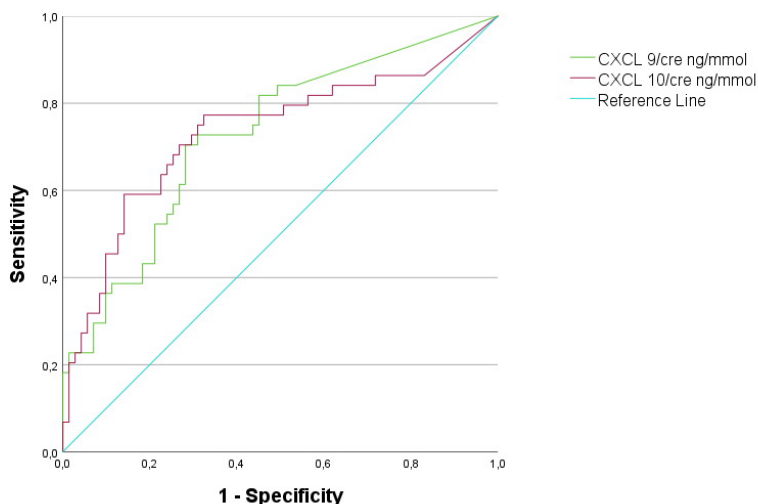
The patients were divided into three groups according to the kidney transplant histology: the *rejection* group, the *normal histology* group, and the *patients with non-rejection histology lesions* group. Urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre levels were compared between all the above mentioned groups.

The median of CXCL9/cre levels in the rejection group (5.55 [IQR 1.04–15.88] ng/mmol) was significantly higher than in the normal histology group (0.00 [IQR 0.00–0.89] ng/mmol) and the other histology group (1.83 [IQR 0.00–9.54] ng/mmol),  $p < 0.05$  (Fig. 1).



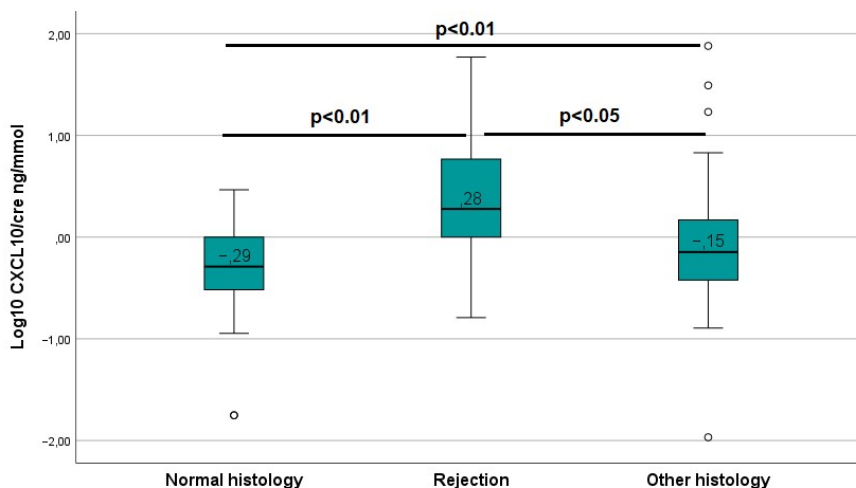
**Fig. 1.** Urinary CXCL9/cre levels in patients with normal transplant histology, allograft rejection and non-rejection allograft lesions.

The diagnostic performance of CXCL9/cre in discriminating transplant rejection from normal histology was estimated by the receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The ROC Area under the curve (AUC) value was 0.857 (95% CI 0.771–0.943,  $p < 0.001$ ). The cut-off value of CXCL9/cre that showed the best sensitivity (70.5%) and specificity (92.3%) was 2.45 ng/mmol. We further tested the CXCL9/cre diagnostic performance while discriminating rejection from all other histological groups (including the normal histology and other histology abnormalities such as recurrent glomerulonephritis, glomerulosclerosis, etc.). The ROC AUC value was 0.728 (95% CI 0.632–0.824,  $p < 0.001$ ), the cut-off value of 0.11 ng/mmol resulted in the best sensitivity (76.9%), and specificity (73.1%) (Fig. 2). The negative predictive value was 82.5%, while the positive predictive value was 48.1%.



**Fig. 2.** The ability of CXCL9/cre and CXCL10/cre to discriminate kidney transplant rejection from all other allograft lesions and normal histology.

The median of CXCL10/cre levels in the rejection group (1.89 [IQR 0.57–5.89] ng/mmol) was significantly higher than in the normal histology group (0.18 [IQR 0.00–0.37] ng/mmol) and the other histology group (0.64 [IQR 0.22–1.47] ng/mmol),  $p < 0.05$  (Fig. 3).



**Fig. 3.** Urinary chemokine CXCL10/cre levels in patients with normal histology, allograft rejection and non-rejection histology lesions.

ROC AUC value for CXCL10/cre discriminating transplant rejection from normal histology was 0.827 (95% CI 0.729–0.925,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2). The cut-off value of CXCL10/cre that showed the best sensitivity (75.6%) and

specificity (88.5%) was 0.65 ng/mmol. The ability of CXCL10/cre to discriminate transplant rejection from all other histological groups had an ROC AUC value of 0.73 (95% CI 0.63–0.84,  $p < 0.001$ ), the cut-off value 0.42 ng/mmol with best sensitivity (71.4%) and specificity (84.6%). The negative predictive value was 78.7%, while the positive predictive value was 48.6%.

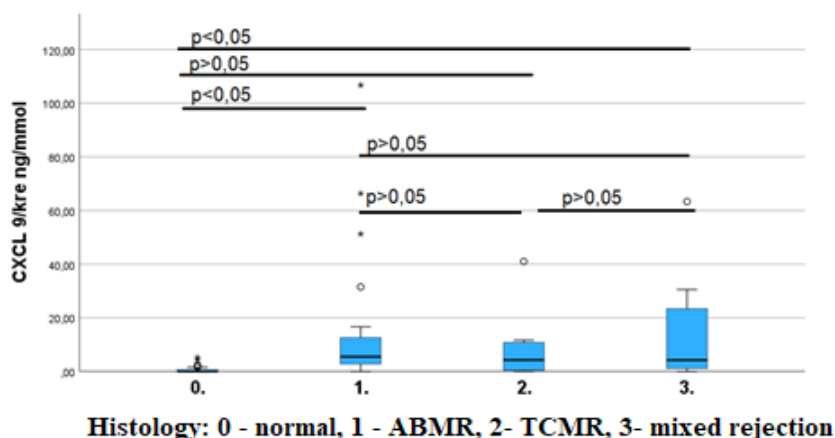
#### CXCL/cre ability to discriminate ABMR and TCMR

Patients with allograft rejection were divided into antibody-mediated (ABMR), T cell-mediated (TCMR) and mixed rejection groups according to the Banff classification criteria. The medians of chemokine levels in different rejection type groups are presented in Table 2.

**Table 2.** Urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre levels in different types of kidney transplant rejection.

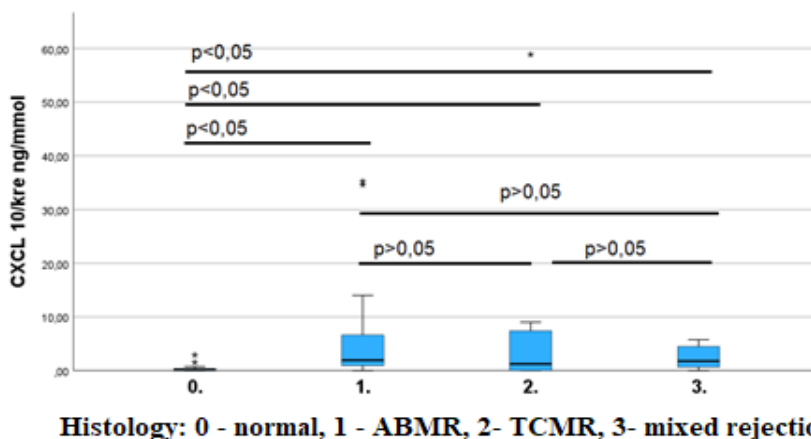
| Chemokine           | Normal histology (n=26), median [IQR] | ABMR (n=25), median [IQR] | TCMR (n=9), median [IQR] | Mixed rejection (n=10), median [IQR] |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| CXCL9/cre, ng/mmol  | 0.00 [0.00–0.89]                      | 5.52 [2.65–13.03]         | 7.76 [0.38–26.36]        | 4.26 [0.84–25.20]                    |
| CXCL10/cre, ng/mmol | 0.17 [0.00–0.37]                      | 1.95 [0.82–6.85]          | 1.26 [0.00–8.21]         | 1.78 [0.58–4.49]                     |

The levels of CXCL9/cre were significantly higher in the ABMR and mixed rejection groups compared to normal histology, however, the CXCL9/cre levels did not differ between the TCMR and the normal histology groups (Figure 4).



**Fig. 4.** CXCL9/cre levels in different types of kidney transplant rejection and normal histology.

The CXCL10/cre levels were compared between different types of rejection, and the obtained results revealed significantly higher levels of this chemokine in each type of rejection compared to the normal histology; however, they did not differ between each type of rejection (Fig. 5).



**Fig. 5.** Urinary CXCL10/cre levels in different types of allograft rejection.

The TCMR and mixed rejection cases were excluded from further analysis, leaving only cases with pure ABMR, normal histology, and other histology lesions (without rejection). CXCL9/cre ability to discriminate ABMR demonstrated an ROC AUC value of 0.73 (95% CI 0.62–0.84,  $p < 0.001$ ). The CXCL10/cre ROC AUC value was higher, specifically, 0.75 (95% CI 0.63–0.87,  $p < 0.001$ ).

We further tested chemokine's ability to detect TCMR; therefore, we excluded cases with ABMR and mixed rejection from further analysis. There were 9 cases of TCMR and 73 cases of normal or other histology. The ROC analysis of CXCL9/cre and CXCL10/cre showed AUC values of 0.67 (95% CI 0.47–0.86,  $P > 0.05$ ) and 0.61 (95% CI 0.35–0.86,  $P > 0.05$ ), respectively, thus revealing a poor ability to identify pure TCMR from normal or other histology lesions. We removed all polyoma BK cases ( $n=5$ ) from further analysis, however, this did not improve the CXCL9/cre and CXCL10/cre values significantly (CXCL9/cre ROC AUC was 0.68, and CXCL10/cre ROC AUC was 0.63, but  $p > 0.05$ ).

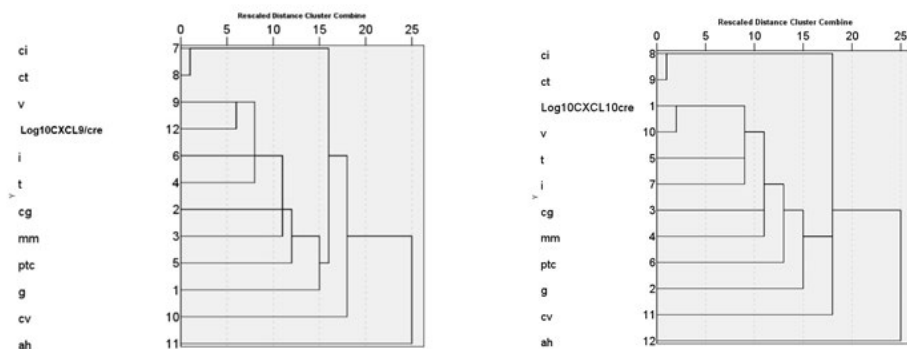
## **II – Association of CXCL9 and CXCL10 with histological lesions according to the Banff classification system**

Firstly, Spearman correlation analysis with chemokine levels and quantitatively evaluated histology lesions (according to the Banff classification system) was performed.

**Table 3.** Spearman correlation coefficients for correlation between log-transformed chemokine levels and histology lesions.

|            |     | g      | cg    | mm    | t    | ptc    | i      | ci   | ct   | v    | cv    | ah    |
|------------|-----|--------|-------|-------|------|--------|--------|------|------|------|-------|-------|
| CXCL9/cre  | rho | 0.24   | 0.17  | -0.07 | 0.08 | 0.39   | 0.31   | 0.13 | 0.08 | 0.19 | 0.02  | -0.01 |
|            | p   | 0.01   | 0.08  | 0.45  | 0.42 | <0.001 | <0.001 | 0.19 | 0.42 | 0.05 | 0.84  | 0.94  |
| CXCL10/cre | rho | 0.32   | 0.18  | 0.02  | 0.24 | 0.41   | 0.36   | 0.05 | 0.06 | 0.22 | -0.02 | -0.01 |
|            | p   | <0.001 | 0.048 | 0.82  | 0.01 | <0.001 | <0.001 | 0.58 | 0.53 | 0.02 | 0.84  | 0.89  |

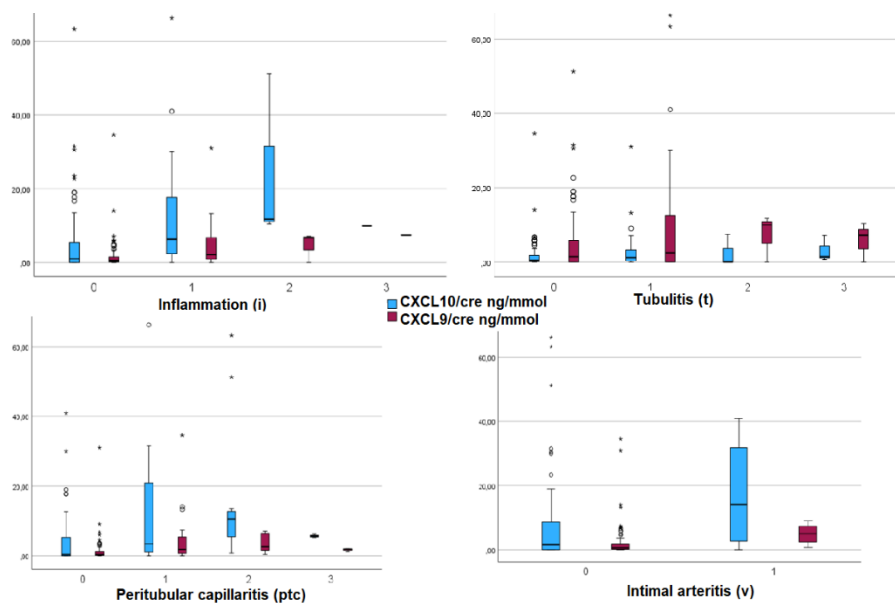
Table 3 shows that both CXCL9/cre and CXCL10/cre significantly correlated with the scores of glomerulitis (g), inflammation of peritubular capillaries (ptc), and inflammation of the interstitium (i). Other lesions such as transplant glomerulopathy (cg), tubulitis (t) and arterial inflammation (v) correlated significantly with CXCL10/cre but not with CXCL9/cre values. Hierarchical cluster analysis showed association of both chemokines with tubulitis, interstitial inflammation, and arterial inflammation (Fig. 6).



**Fig. 6.** Association between chemokines and Banff histology lesions, as revealed by hierarchical cluster analysis.

When the subjects were grouped according to the scores of each of the Banff criteria, the CXCL9/kre and CXCL10/kre levels were significantly higher in patients with more pronounced interstitial inflammation and peritubular capillaritis in biopsies (Fig. 7). Both chemokine concentrations were higher in patients with tubulitis: the median CXCL9/cre was 2.94 ng/mmol [IQR 0.00–11.85 ng/mmol] compared to a median of 1.45 ng/mmol [IQR 0.00–6.00 ng/mmol] in patients without tubulitis,  $p < 0.01$ . The mean concentration of CXCL10/cre was also higher in the tubulitis group (1.26 ng/mmol [0.17–3.93 ng/mmol]) compared to the non-tubulitis group (0.51 ng/mmol [0.17–1.82 ng/mmol]),  $p < 0.05$ .

A higher concentration of either of both chemokines was also found in patients with glomerulitis, arterial inflammation, but only CXCL9/cre concentration was higher in patients with pronounced interstitial fibrosis, although all these findings were not statistically significant.



**Fig. 7.** Boxplots showing increased urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre levels in higher scores of Banff histology lesions.

After performing univariate linear regression analysis with chemokine concentrations and obtaining the Banff criteria scores, it was found that interstitial inflammation (i), peritubular capillaritis (ptc) and vascular intimal inflammation (v) were significantly related to logarithmic CXCL9/cre values (see Table 4).

**Table 4.** Univariate linear regression analysis with chemokine CXCL9/cre concentrations and Banff criteria scores.

| Banff criteria | Regression coefficient $\pm$ SE | p value |
|----------------|---------------------------------|---------|
| g              | $0.273 \pm 0.117$               | 0.145   |
| cg             | $0.022 \pm 0.109$               | 0.844   |
| mm             | $-0.27 \pm 0.097$               | 0.779   |
| t              | $-0.121 \pm 0.105$              | 0.254   |
| ptc            | $0.183 \pm 0.088$               | 0.040*  |
| i              | $0.478 \pm 0.153$               | 0.002*  |
| ci             | $0.089 \pm 0.128$               | 0.486   |
| ct             | $0.027 \pm 0.148$               | 0.854   |
| v              | $0.648 \pm 0.234$               | 0.007*  |
| cv             | $-0.041 \pm 0.082$              | 0.614   |
| ah             | $-0.047 \pm 0.072$              | 0.510   |

\* - p value < 0.05.

The influence of the Banff criteria on CXCL9/cre concentration was further examined by using multivariate linear regression: in the created model, the Banff criteria *i*, *t*, as well as the most influential criterion *v* remained significant (see Table 5).

**Table 5.** Banff criteria *ptc*, *i* and *v* remained significant in multivariate linear regression analysis model.

| Banff criterion | Regression coefficient $\pm$ SE | p value |
|-----------------|---------------------------------|---------|
| <i>ptc</i>      | $0.234 \pm 0.079$               | 0.004*  |
| <i>i</i>        | $0.362 \pm 0.114$               | 0.002*  |
| <i>v</i>        | $0.688 \pm 0.227$               | 0.003*  |

Determination coefficient  $R^2 = 0.231$ . Constant 0.300,  $p < 0.001$ .

When further examining the influence of the Banff classification histological criteria on the urinary CXCL10/cre concentration, univariate linear regression revealed that criteria *i*, *v*, and *g* were significant (see Table 6). They were included in a multiple linear regression model, where they retained their significance (see Table 7).

**Table 6.** Univariate linear regression analysis with chemokine CXCL10/cre concentrations and Banff criteria scores.

| Banff criterion | Regression coefficient $\pm$ SE | p value |
|-----------------|---------------------------------|---------|
| <i>g</i>        | $0.234 \pm 0.108$               | 0.053   |
| <i>cg</i>       | $0.087 \pm 0.101$               | 0.391   |
| <i>mm</i>       | $0.016 \pm 0.090$               | 0.860   |
| <i>t</i>        | $0.036 \pm 0.097$               | 0.713   |
| <i>ptc</i>      | $0.159 \pm 0.081$               | 0.040*  |
| <i>i</i>        | $0.422 \pm 0.141$               | 0.004*  |
| <i>ci</i>       | $-0.110 \pm 0.118$              | 0.355   |
| <i>ct</i>       | $0.110 \pm 0.137$               | 0.421   |
| <i>v</i>        | $0.662 \pm 0.216$               | 0.003*  |
| <i>cv</i>       | $0.004 \pm 0.075$               | 0.960   |
| <i>ah</i>       | $-0.043 \pm 0.062$              | 0.520   |

\* - p value  $< 0.05$ .

**Table 7.** Significance of Banff criteria *g*, *i*, and *v* as confirmed by multivariate linear regression analysis, in determining CXCL10/cre levels.

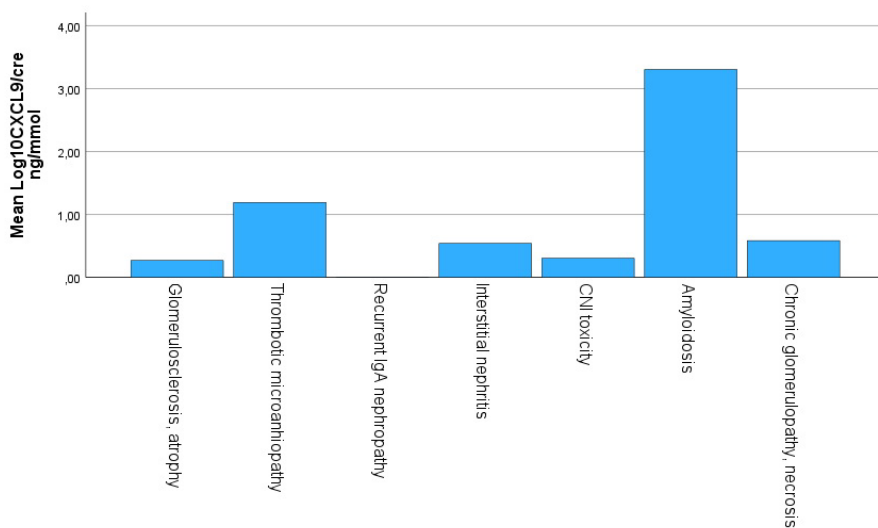
| Banff criterion | Regression coefficient $\pm$ SE | p value |
|-----------------|---------------------------------|---------|
| <i>g</i>        | $0.318 \pm 0.094$               | 0.001*  |
| <i>i</i>        | $0.427 \pm 0.104$               | <0.001* |
| <i>v</i>        | $0.318 \pm 0.094$               | 0.001*  |

Determination coefficient  $R^2 = 0.269$ . Constant -0.182,  $p < 0.001$ .

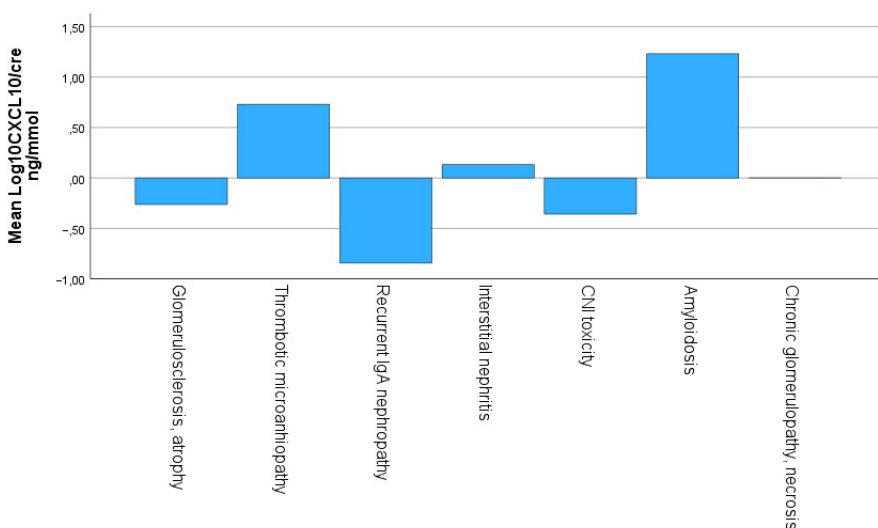
### **III – Association of chemokines CXCL9 and CXCL10 to other kidney transplant pathologies (polyoma BK virus infection, recurrent glomerulonephritis)**

Of the 117 subjects, 5 (4.3%) patients had biopsy-proven polyoma BK virus nephropathy. The medians for CXCL9/cre and CXCL10/cre levels in these patients were 9.91 [IQR 3.58–24.49] ng/mmol and 4.94 [IQR 1.10–18.88] ng/mmol, respectively. These concentrations were significantly higher compared to the concentrations in the normal histology group ( $p < 0.05$ ), but were not significantly different from the median chemokine concentrations in the rejection group.

Chemokine levels were analyzed in patients with histological diagnoses other than rejection: diffuse glomerulosclerosis was found in 17 patients, thrombotic microangiopathy without rejection in 3 patients, IgA nephropathy was established in 3 patients, interstitial nephritis was observed in 3 patients, signs of calcineurin inhibitor toxicity were found in 8 patients, and AA amyloidosis was detected in 1 patient. Levels of both chemokines were elevated in thrombotic microangiopathy, amyloidosis, and, to a lesser extent, in interstitial nephritis, but chemokine levels were low in diffuse glomerulosclerosis, IgA nephropathy, and calcineurin inhibitor toxicity (see Figures 8–9).



**Fig. 8.** CXCL9/cre levels in patients with non-rejection kidney allograft pathology.

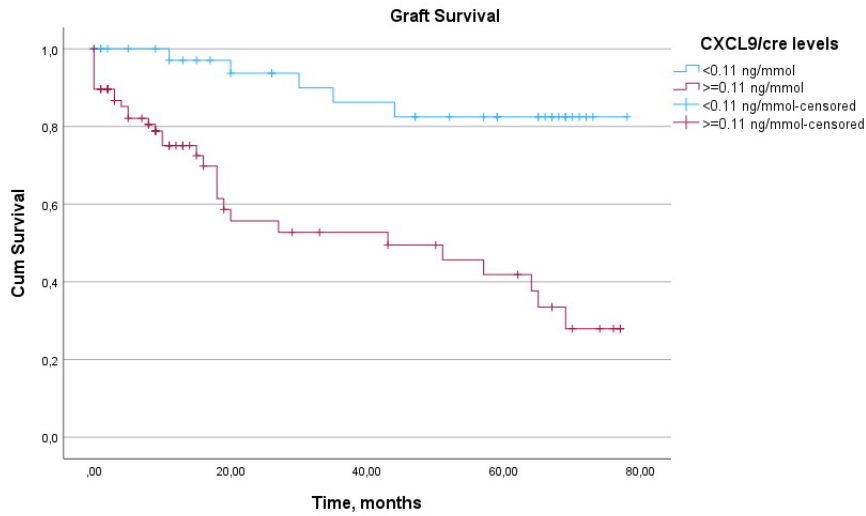


**Fig. 9.** CXCL10/cre levels in patients with non-rejection kidney allograft pathology.

#### **IV – Chemokines CXCL9 and CXCL10 and kidney transplant survival**

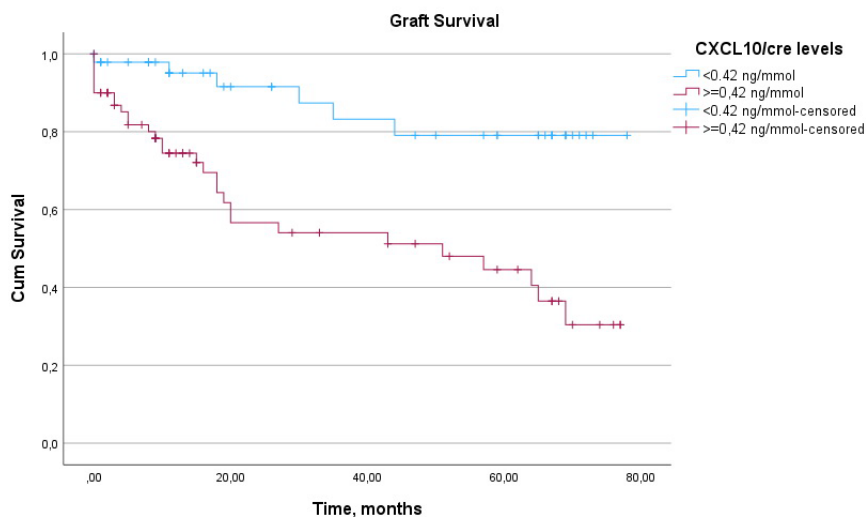
The association between chemokines and graft survival (i.e., the time from kidney biopsy to the initiation of permanent dialysis) was examined. Multiple Cox regression analysis was performed. Patients with elevated ( $\geq 0.11$  ng/mmol) CXCL9/cre were at an increased risk of developing end-stage renal

graft failure (HR 5.16, 95% CI 1.85–14.42,  $p < 0.01$ ), independent of the patient's age, sex, serum creatinine conc. during biopsy and histologically determined rejection diagnoses. Of all patients with elevated CXCL9/cre, 40.3% required initiation of dialysis during the follow-up period, compared to 12.5% of patients with low CXCL9/cre ( $p < 0.05$ ) (see Fig. 10). The overall median follow-up period for both groups was 15.0 months [CI 6.0–58.0].



**Fig. 10.** Allograft survival in patients with low and high levels of CXCL9/cre.

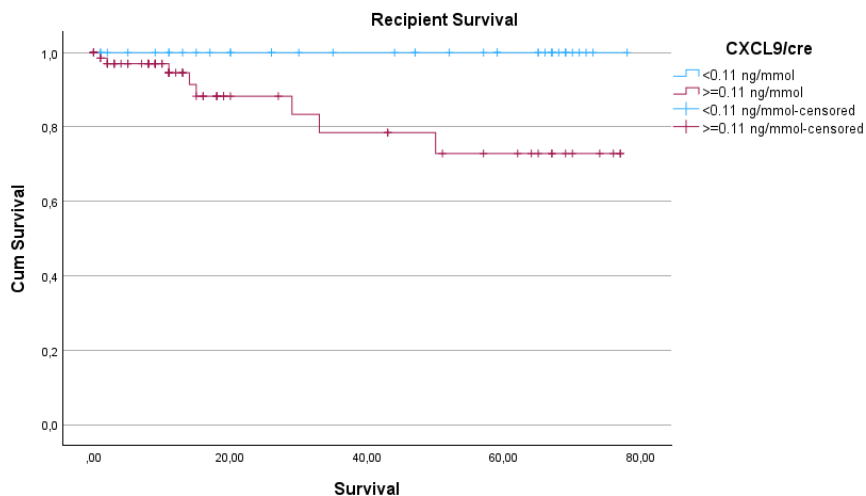
Patients with increased CXCL10/cre levels ( $\geq 0.42$  ng/mmol) were also more likely to start dialysis; the odds ratio was 3.25, 95% CI 1.27–8.36,  $p = 0.01$ . Only 12.8% of patients with low CXCL10/cre levels started dialysis compared to 42.9% of patients with elevated CXCL10/cre levels ( $p < 0.05$ ) (see Fig. 11).



**Fig. 11.** Kidney transplant survival in patients with low and increased levels of urinary CXCL10/cre.

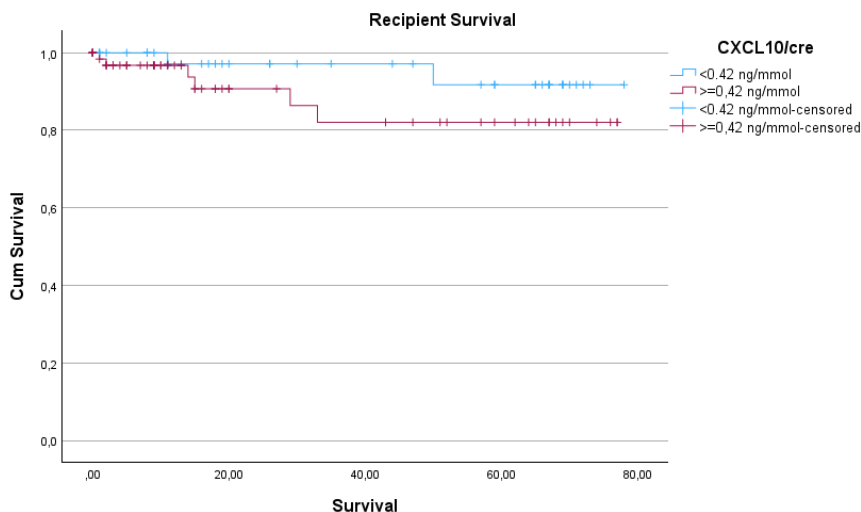
### Chemokines and recipient survival

The influence of chemokines on recipient survival was further analyzed. Among patients with CXCL9/kre levels  $<0.11$  ng/mmol, there were no deaths during the entire follow-up period, whereas, among patients with elevated CXCL9/kre levels (77), only 69 (89.6%) patients survived,  $p < 0.05$ . The survival curve is shown in Figure 12.



**Fig. 12.** Recipient survival Kaplan-Meier curve comparing patients with normal and increased levels of urinary CXCL9/cre.

Of 47 recipients with CXCL10/cre <0.42 ng/mmol, 45 (95.8%) patients survived compared to 91.4% of recipients with an increased CXCL10/cre value. The median survival in the low and high CXCL10/cre groups was 74.6 and 66.8 months, respectively, but it did not differ significantly ( $p > 0.05$ ). The survival curve is shown in Figure 13.



**Fig. 13.** Recipient survival Kaplan-Meier curve comparing patients with normal and increased levels of urinary CXCL10/cre.

### **V – Relationship of diCBCi with chemokines CXCL9 and CXCL10 and graft rejection**

We calculated diCBCi according to the formulas used in the practice of endobiogenic medicine [89]. In the present work, we used only those diCBCi values which could be derived from the complete blood count parameters. The complete blood count test was performed 1–7 days before the kidney transplant biopsy and urine sample collection for chemokine detection.

**Table 7.** diCBCi median values in a cohort of 117 kidney transplant recipients and the percentage of patients with normal, lower-than-normal, or higher-than-normal index values. diCBCi index formulas are presented in the Table.

| Index                        | Formula                                  | Normal Limits | Median               | % of Patients with a LOW Index Value | % of patients with a NORMAL Index Value | % of Patients with a HIGH Index Value |
|------------------------------|------------------------------------------|---------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Adaptation                   | Eos/Mon                                  | 0.25–0.50     | 0.11 [0.07–0.21]     | 76.9                                 | 12.0                                    | 11.1                                  |
| LMI                          | (PLT × Neu × HgB)/(30,000 × WBCs)        | 0.85–1.15     | 0.76 [0.60–0.92]     | 59.8                                 | 32.5                                    | 7.7                                   |
| PMI                          | PLT/(60 × RBCs)                          | 0.85–1.15     | 0.85 [0.66–1.11]     | 47.9                                 | 34.2                                    | 17.9                                  |
| Starter                      | LMI/PMI                                  | 0.85–1.15     | 0.90 [0.67–1.18]     | 42.7                                 | 30.8                                    | 26.5                                  |
| Cata-Ana                     | GT ratio/(Genital ratio × Starter index) | 1.80–3.0      | 4.99 [2.92–8.00]     | 6.8                                  | 23.9                                    | 69.2                                  |
| GT ratio                     | Neu/Lymph                                | 1.50–2.50     | 3.07 [2.19–4.21]     | 10.3                                 | 30.8                                    | 59.0                                  |
| Genital ratio                | RBCs/WBCs                                | 0.80–0.95     | 0.63 [0.45–0.76]     | 76.1                                 | 16.2                                    | 7.7                                   |
| Adjusted Genital ratio       | Genital ratio index × Starter index      | 0.85–1.05     | 0.58 [0.30–0.86]     | 70.1                                 | 17.1                                    | 12.8                                  |
| Adrenal Gland                | GT ratio/(Genital ratio) <sup>2</sup>    | 2.70–3.30     | 7.61 [4.01–16.37]    | 12.0                                 | 12.8                                    | 75.2                                  |
| Cortisol                     | Cata-ana index/Adaptat ion index         | 3–7           | 37.42 [16.42–111.53] | 2.6                                  | 14.5                                    | 82.9                                  |
| Cortisol/Adrenal Gland Ratio |                                          | 3             |                      | 19.7                                 | 18.8                                    | 61.5                                  |
| TRH reactivation             | Mon/Lymph                                | 0.05–0.25     | 0.44 [0.29–0.59]     | 1.7                                  | 15.4                                    | 82.9                                  |

Eos – eosinophils (in %), Lymph – lymphocytes (in %), Mon – monocytes (in %), Neu – neutrophils (in %), PLT – platelets (in units/mm<sup>3</sup>, i.e., 185,000), RBCs – red blood cells (in thousands/mm<sup>3</sup>, i.e., 4400), and WBCs – white blood cells (in units/mm<sup>3</sup>, i.e., 6100).

The median of each diCBCi was calculated in the whole patient cohort, as presented in Table 7. Only a minority of individuals (12–34%) had diCBCi values assumed as normal, according to the general population data. More than 50% of the patients had low adaptation, LMI, genital, and adjusted genital ratio indices, while other indices associated with catabolism or activation of the corticotropic axis (Cata-Ana, GT ratio, adrenal gland, and cortisol indices) were high in >50% of the patients. In the subgroup of the patients with normal kidney transplant histology (no rejection or other abnormalities), these tendencies were even more prominent: a higher percentage of patients had low adaptation, LMI, PMI, genital, and adjusted genital ratio indices, as well as a high corticotropic axis index (see Table 8).

**Table 8.** Patients with normal transplant histology: percentage of patients with low, normal, and high values of each diCBCi.

| Index                  | % of Patients with a LOW Index Value | % of Patients with a NORMAL Index Value | % of Patients with a HIGH Index Value |
|------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Adaptation             | 96.2                                 | 0                                       | 3.8                                   |
| LMI                    | 65.4                                 | 30.8                                    | 3.8                                   |
| PMI                    | 50.0                                 | 38.5                                    | 11.5                                  |
| Starter                | 38.5                                 | 26.9                                    | 34.6                                  |
| Cata-Ana               | 11.5                                 | 19.2                                    | 69.2                                  |
| GT ratio               | 15.4                                 | 34.6                                    | 50.0                                  |
| Genital ratio          | 84.6                                 | 7.7                                     | 7.7                                   |
| Adjusted Genital ratio | 73.1                                 | 15.4                                    | 11.5                                  |
| Adrenal Gland          | 11.5                                 | 3.8                                     | 84.6                                  |
| Cortisol               | 3.8                                  | 7.7                                     | 88.5                                  |
| TRH reactivation       | 0                                    | 7.7                                     | 92.3                                  |

### diCBCi and urinary chemokines CXCL9 and CXCL10

First, a correlation analysis was performed to assess the relationship between diCBCi and chemokines. The Spearman correlation coefficient was calculated; its results are presented in Table 9. A direct significant correlation was found between the adaptation index, the geniro-thyroid index, and CXCL9/cre and CXCL10/cre.

**Table 9.** Correlations of CXCL9/cre and CXCL10/cre with diCBCi. Statistically significant correlations are marked with \* when  $p < 0.05$  and \*\* when  $p < 0.01$ .

| Index            | CXCL9/cre | CXCL10/cre |
|------------------|-----------|------------|
| Cata-Ana         | 0.175     | 0.097      |
| Adaptation       | 0.202*    | 0.318**    |
| Adrenal Gland    | 0.083     | 0.061      |
| Cortisol         | -0.053    | -0.150     |
| Genital ratio    | 0.059     | 0.113      |
| Adjusted Genital | 0.020     | 0.097      |
| LMI              | 0.08      | 0.079      |
| PMI              | 0.061     | -0.068     |
| Starter          | -0.020    | 0.077      |
| GT ratio         | 0.316**   | 0.231*     |
| TRH reactivation | 0.183     | 0.171      |

The medians of CXCL/cre in the groups of an increased, normal and decreased adaptation index and the genital-thyroid ratio index were calculated. Only the adaptation index values were significantly increased in patients with higher levels of urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre (see Table 10).

**Table 10.** Median index values in patients with normal or elevated urinary chemokine levels.

| Chemokine  | Chemokine levels | Adaptation index median [IQR] | P value | GT ratio index median [IQR] | P value |
|------------|------------------|-------------------------------|---------|-----------------------------|---------|
| CXCL9/cre  | Normal           | 0.1<br>[0.06–0.16]            | 0.008   | 2.69<br>[1.89–3.73]         | 0.134   |
|            | Increased        | 0,14<br>[0.08–0.29]           |         | 3.19<br>[2.25–4.55]         |         |
| CXCL10/cre | Normal           | 0.09<br>[0.05–0.14]           | 0.003   | 2.76<br>[2.02–3.68]         | 0.538   |
|            | Increased        | 0.16<br>[0.09–0.31]           |         | 3.19<br>[2.23–5.34]         |         |

#### diCBCi and kidney transplant rejection

The patients were divided into two groups according to the histological diagnosis: patients without rejection on histology (non-rejectors:  $n = 70$ ) and patients with transplant rejection (rejectors:  $n = 41$ ). The index values were compared between the two groups by using the Mann-Whitney test (see Table 11). The adaptation index was significantly higher in patients with biopsy-proven transplant rejection, while the ratio of cortisol to the adrenal gland index was significantly higher in the non-rejector group. The latter group included cases with normal histology and other-than-rejection histology abnormalities (e.g., recurrent glomerulonephritis and global glomerulosclerosis). The same significant results were observed when the indices were compared between the pure normal histology ( $n = 26$ ) and rejection groups.

**Table 11.** Median [IQR] diCBCi values in patients with biopsy-proven transplant rejection and patients with no rejection (normal histology or other histological abnormalities such as global glomerulosclerosis or recurrent glomerulonephritis).

| <b>Parameter</b>                                  | <b>Rejectors<br/>(median [IQR])</b> | <b>n-rejectors,<br/>(median [IQR])</b> | <b><i>p</i> value</b> |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| Age, years                                        | 46.0 [36.0–58.0]                    | 46.0 [31.0–55.5]                       | 0.585                 |
| BMI, kg/m <sup>2</sup>                            | 24.6 [21.6–29.0]                    | 23.3 [20.7–27.9]                       | 0.117                 |
| Overall years on immunosuppression.               | 6.0 [1.0–11.0]                      | 3.0 [0.75–11.0]                        | 0.330                 |
| Creatinine conc. (μmol/l) at biopsy               | 216.0 [150.3–371.5]                 | 165.5 [119.5–318.5]                    | 0.055                 |
| Creatinine conc., (μmol/l), 3 months after biopsy | 187.0 [137.0–388.0]                 | 137.0 [105.0–219.5]                    | 0.031*                |
| Tacrolimus conc., ng/ml                           | 4.9 [4.0–10.3]                      | 5.8 [4.3–7.2]                          | 0.797                 |
| Leukocytes, 10e9/l                                | 6.4 [5.1–8.7]                       | 6.8 [5.6–8.4]                          | 0.634                 |
| Neutrophils, %                                    | 65.8 [60.0–72.4]                    | 66.0 [58.7–71.3]                       | 0.545                 |
| Lymphocytes, %                                    | 21.6 [17.7–27.5]                    | 21.2 [16.2–28.4]                       | 0.876                 |
| Monocytes, %                                      | 8.2 [7.0–10.8]                      | 9.5 [8.0–11.4]                         | 0.046*                |
| MMF dose, g                                       | 1.5 [1.0–2.0]                       | 2.0 [1.4–2.0]                          | 0.166                 |
| <b>diCBCi</b>                                     |                                     |                                        |                       |
| Adaptation                                        | 0.15 [0.09–0.43]                    | 0.10 [0.05–0.18]                       | 0.009 **              |
| LMI                                               | 0.80 [0.61–0.96]                    | 0.71 [0.58–0.90]                       | 0.172                 |
| PMI                                               | 0.79 [0.64–1.09]                    | 0.87 [0.66–1.12]                       | 0.621                 |
| Starter                                           | 0.98 [0.70–1.27]                    | 0.87 [0.64–1.15]                       | 0.236                 |
| Catabolism- anabolism                             | 4.5 [2.91–8.29]                     | 5.02 [3.01–8.01]                       | 0.779                 |
| GT ratio                                          | 2.98 [2.23–4.06]                    | 0.62 [0.44–0.72]                       | 0.908                 |
| Cortisol                                          | 29.54 [10.21–87.94]                 | 47.39 [18.50–126.40]                   | 0.157                 |
| Genital ratio                                     | 0.67 [0.45–0.80]                    | 0.62 [0.44–0.72]                       | 0.460                 |

| <b>Parameter</b>             | <b>Rejectors<br/>(median [IQR])</b> | <b>n-rejectors,<br/>(median [IQR])</b> | <b><i>p</i> value</b> |
|------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| Adrenal Gland                | 6.67 [3.27–17.61]                   | 8.21 [4.30–16.65]                      | 0.467                 |
| Adjusted genital ratio       | 0.69 [0.31–0.97]                    | 0.53 [0.30–0.82]                       | 0.258                 |
| Cortisol/adrenal gland ratio | 3.77 [1.86–6.66]                    | 5.71 [3.41–9.40]                       | 0.013 *               |
| TRH reactivation             | 0.41 [0.28–0.56]                    | 0.47 [0.30–0.65]                       | 0.259                 |

\*\* - Significance at the 0.01 level. \* - Significance at the 0.05 level.

## Cortisol and Adrenal Gland Index ratio

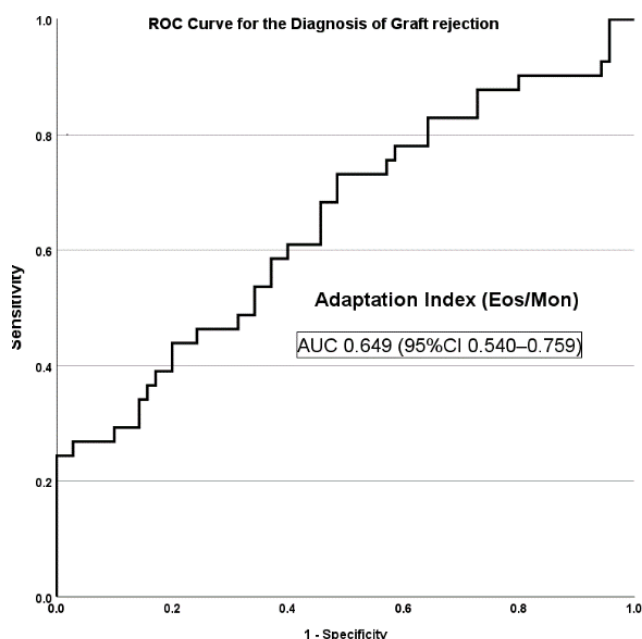
The cortisol index should be interpreted together with the adrenal gland index; normally, this ratio should be ~3. In our cohort, only 22 (18.8%) patients had a normal cortisol/adrenal gland index ratio. In this group of the normal ratio patients, only 9.1% had a normal renal histology, whereas 31.8% experienced transplant rejection, and 59.1% had other abnormalities on kidney biopsy. Furthermore, 13.6% of the patients lost their transplant during the 12 months after graft biopsy, 50% of the patients had a functioning graft 1 year after the biopsy, and 36.4% of the patients had less than 12 months of the follow-up.

The patient group with an increased cortisol/adrenal gland index ratio had significantly fewer transplant rejection cases (31.9%) compared to the patients with a low cortisol/adrenal gland index ratio (60.9%;  $p < 0.05$ ); however, the cortisol/adrenal gland index AUC for discriminating the patients with transplant rejection was only 0.356 (CI 0.246–0.467).

A total of 91% of the patients with a low cortisol/adrenal gland index ratio received methylprednisolone (median dose: 8 mg), while 92% of the patients with a high cortisol/adrenal gland index ratio received methylprednisolone (median dose: 6 mg). The median times (months) after the transplantation in groups with low, normal, and high ratios were 36.00, 81.00, and 12.00, respectively, but significantly differed only between the groups with normal and high ratios ( $p < 0.05$ ).

## Adaptation index and allograft rejection

Our data analysis revealed that more than two-thirds of the kidney transplant recipients had a decreased adaptation index, while patients with biopsy-proven transplant rejection had significantly higher adaptation index values. The ROC analysis of the adaptation index showed an AUC value of 0.649 (95%CI 0.540–0.759) for detecting biopsy-proven kidney transplant rejection (see Figure 14).



**Fig. 14.** Adaptation index ROC curve for discriminating patients with and without kidney transplant rejection.

#### diCBCi and kidney transplant survival

The patients were divided into two groups: one group included patients with graft loss within one year after the biopsy ( $n = 18$ ), while the second group included patients without graft loss within one year after the biopsy.

Non-parametric statistical tests (specifically, the Mann-Whitney U test) were performed to compare different characteristics between the graft loss group and the patients with a working graft (see Table 12). Only the serum creatinine levels were significantly higher in the graft loss group; however, there was a tendency towards a lower genital ratio, starter, and adjusted genital ratio in the graft loss group, although these differences were not significant.

**Table 12.** Characteristics and diCBCi in patients with and without graft loss during the follow-up of 12 months after kidney biopsy.

| Characteristics                                       | Graft Loss<br>(Median [IQR]) | No Graft Loss<br>(Median [IQR]) | <i>p</i> -Value |
|-------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Patient age                                           | 31.50 [28.00–56.50]          | 43.50 [31.2–53.75]              | 0.222           |
| BMI                                                   | 21.92 [20.62–26.00]          | 24.62 [20.82–28.69]             | 0.431           |
| Creatinine at biopsy, $\mu\text{mol/l}$               | 430.00 [294.50–472.50]       | 155.00 [121.00–231.00]          | <0.001 *        |
| Creatinine at 1 month after biopsy, $\mu\text{mol/l}$ | 235.73 [148.00–314.00]       | 216.18 [110.75–247.50]          | 0.042 *         |
| Creatinine 3 months after biopsy, $\mu\text{mol/l y}$ | 323.50 [221.25–386.25]       | 128.00 [108.00–175.00]          | 0.043 *         |
| Creatinine 6 months after biopsy, $\mu\text{mol/l}$   | 385.50 [313.5–506.5]         | 153.00 [108.50–218.00]          | 0.023 *         |
| Biopsy time after transplantation                     | 48.50 [11.50–107.5]          | 16.00 [8.00–73.50]              | 0.161           |
| C-reactive protein                                    | 1.03 [0.29–8.25]             | 1.70 [0.90–3.77]                | 0.932           |
| Tacrolimus level, ng/ml                               | 5.00 [3.68–7.68]             | 5.90 [4.00–7.70]                | 0.780           |
| Mycophenolate dose, g                                 | 1.5 [1.0–2.0]                | 2.0 [1.4–2.0]                   | 0.166           |
| Steroid dose, mg                                      | 8.00 [4.00–9.00]             | 4.00 [4.00–8.00]                | 0.119           |
| BoF Indices:                                          |                              |                                 |                 |
| Adaptation                                            | 0.11 [0.04–0.28]             | 0.12 [0.07–0.20]                | 0.838           |
| Cata-Ana                                              | 6.98 [3.08–19.96]            | 4.80 [2.57–6.78]                | 0.735           |
| GT ratio                                              | 3.94 [2.32–7.56]             | 2.91 [2.08–3.62]                | 0.378           |
| Cortisol                                              | 58.24 [9.87–155.48]          | 39.25 [14.51–95.47]             | 0.776           |
| Genital ratio                                         | 0.44 [0.39–0.69]             | 0.64 [0.45–0.80]                | 0.067           |
| Adrenal gland                                         | 12.44 [4.50–41.89]           | 7.48 [3.17–15.33]               | 0.378           |
| TRH reactivation                                      | 0.44 [0.19–0.72]             | 0.42 [0.30–0.52]                | 0.838           |
| LMI                                                   | 0.59 [0.50–0.88]             | 0.80 [0.62–0.97]                | 0.197           |
| PMI                                                   | 0.90 [0.76–1.11]             | 0.75 [0.63–1.04]                | 0.154           |
| Starter                                               | 0.73 [0.49–1.03]             | 1.03 [0.76–1.27]                | 0.067           |
| Adjusted genital ratio                                | 0.31 [0.16–0.72]             | 0.69 [0.35–0.96]                | 0.067           |

## DISCUSSION

### I. Properties of urinary biomarkers CXCL9 and CXCL10 for the diagnosis of biopsy-proven kidney transplant rejection

The results of this work have shown that both chemokines, CXCL9 and CXCL10, have good discriminatory properties in distinguishing graft rejection from the normal histology and, to a lesser extent, rejection from any other graft pathology. The results of this work are in agreement with the data already published in the literature. In a study published by Loon and co-authors, the area under the ROC AUC value for urinary chemokine logCXCL9/cre in the diagnosis of acute renal transplant rejection was 0.72 [109]. In our data, the ROC value for CXCL9/cre was similar, notably, 0.73.

For the ability of CXCL10/cre to differentiate antibody-mediated rejection from other non-rejection-related histological groups, we have found a ROC area under the curve value of 0.75. At least two independent authors obtained a relatively close ROC value of 0.76 for CXCL10/cre [125,126]. Meanwhile, other authors obtained the ROC values for CXCL10/cre equaling to 0.70 or 0.74 [98,109].

According to our data, only chemokine CXCL9/cre showed sufficient discriminative properties in distinguishing cellular rejection from the normal histology, but not from all other non-rejection histological groups. AUC values for CXCL10/cre were insufficient to differentiate cellular rejection from normal and from all other histological groups. However, Ho et al. reported that the ROC value of CXCL10 was 0.81 (95% CI 0.74–0.88) in distinguishing between cellular rejection, and 71 cases of moderate and severe cellular rejection were included in this study. It is likely that such differences could have been obtained due to the fact that there were only 9 cases of cellular rejection in our study group of patients.

However, neither the CXCL9/cre markers nor the CXCL10/cre markers allow the diagnosis of the type of graft rejection (ABMR versus TCMR). In general, the treatment of graft rejection is different for each of these types: antibody-mediated rejection is treated with plasmapheresis, intravenous immunoglobulin, rituximab, whereas cellular rejection is treated with steroid hormone infusion or antithymocyte immunoglobulin [43,27,128]. Thus, chemokine markers alone are not sufficient for an accurate diagnosis of rejection, and therefore a biopsy of the kidney graft is required before the initiation of treatment.

In this work, the threshold value for CXCL10/cre to distinguish rejection from other histological findings was set at 0.42 ng/mmol. The threshold values are fairly varied in the literature. The optimal CXCL10/cre threshold for subclinical rejection was 1.535 ng/mmol, whereas the CXCL10/cre threshold for clinically significant rejection was 2.586 ng/mmol in the study by Minkowski et al. [82]. However, in this study, graft rejection was evaluated according to only three histological lesions of the Banff classification system – inflammation of the interstitium (i), tubulitis (t) and inflammation of the vascular intima (v), and subclinical and clinically expressed graft rejection was interpreted as rejection in protocol and indication graft biopsies, respectively. Other authors reported a cut-off value of 0.43 ng/mmol for CXCL10/cre to distinguish rejection from all other histological groups, and this result is very close to our data [71,98].

In this study, CXCL9/cre had a good negative predictive value (82.5%) and a small positive prognostic value (48.1%). In the CTOT-01 consortium study, higher predictive values of CXCL9 in the diagnosis of acute graft rejection were obtained: the positive value was 67%, whereas the negative value was 96% [96].

Mühlbacher and co-authors reported that CXCL9, but not CXCL10, has value in the diagnosis of subclinical late antibody-mediated graft rejection in the presence of elevated DSA titers [72].

Based on our work comparing the properties of CXCL9 and CXCL10 biomarkers in the diagnosis of kidney transplant rejection, it can be stated that CXCL9/cre better identifies rejection (both overall, cellular and antibody-mediated) from normal histology, but equally well as CXCL10/cre differentiates rejection from all other histological groups

## II. Association of CXCL9 and CXCL10 with individual histological lesions according to the Banff classification system

The results of this study showed that CXCL9/cre and CXCL10/cre levels were higher in the cases of more pronounced interstitial inflammation (i), peritubular capillaritis (ptc), and vascular intima inflammation (v). Glomerulitis was significantly associated only with the CXCL10/cre values. This relationship between chemokines and histological lesions was confirmed by other published articles, moreover, Arnau and co-authors proved that CXCL10/cre is associated not only with the *g* and *ptc* scores, but also with chronic glomerulopathy (cg) [85,98,125]. However, some authors found associations of CXCL10/cre with peritubular capillaritis, but not with glomerulitis or isolated vascular intimal damage (v) [126].

The fact that only CXCL10/cre was significantly associated with glomerulitis in this work would indicate the involvement of this chemokine in the pathogenesis of ABMR, as glomerulitis is one of the hallmarks of this type of rejection [18]. Meanwhile, CXCL9/cre was primarily associated with cellular rejection and tubulitis in publications, but, in this work, there was a relatively small number of tubulitis cases, and therefore this histological lesion was analyzed without following the grading of the Banff classification criteria (t0, t1, t2, t3), but, instead, by combining the cases into two groups (t0 and t1-3) [83]. Perhaps due to the small sample size, no significant association between CXCL levels and tubulitis was obtained.

Thus, the data of this work show the association of chemokines with the histological expression of acute graft rejection (both TCMR (v, i) and ABMR (g, ptc)), but we did not find clear associations between signs of chronic graft injury and the chemokine levels. However, similarly to the work published by Arnau and co-authors, we observed a positive correlation between CXCL10/cre and fibrotic vascular intimal thickening (cv) [103]. There is some evidence that CXCL10 is involved in the pathogenesis of renal tissue fibrosis, as mice with blocked CXCL10 production showed milder fibrosis than the control mice after renal injury [129].

### III. Evaluation of the association of chemokines CXCL9 and CXCL10 to other kidney transplant pathologies (polyoma BK virus infection, recurrent glomerulonephritis)

Chemokine concentrations were elevated in cases of histologically confirmed polyoma BK virus nephropathy, and they were not significantly different from the graft rejection group. This corresponds to the data presented in the literature [56, 84, 101].

Interestingly, the concentrations of both chemokines were increased in cases of thrombotic microangiopathy and amyloidosis, to a lesser extent in interstitial nephritis, but, in diffuse glomerulosclerosis, IgA nephropathy and calcineurin inhibitor toxicity, chemokine levels were low.

In this study group, only one patient had biopsy proven transplant amyloidosis, which was type AA amyloidosis. Since AA amyloidosis is a disease associated with chronic protracted inflammation, and the chemokines CXCL9 and CXCL10 are proinflammatory cytokines, it is likely that the levels of these chemokines may increase in this disease [131].

In thrombotic microangiopathy, CXCL10 was significantly more elevated than CXCL9. Thrombotic microangiopathy is manifested by thrombosis of small blood vessels and organ damage when the complement system is activated [132]. CXCL10 is known to be involved in the pathogenesis of thrombotic microangiopathy by promoting inflammation and migration of immune cells into damaged small vessels [133]. CXCL10 activates T lymphocytes and macrophages, thereby promoting an inflammatory response and endothelial damage. The involvement of CXCL10 in the pathogenesis of thrombotic microangiopathy is supported by the fact that patients with thrombotic microangiopathy have an increased concentration of CXCL10 [134]. Meanwhile, data on CXCL9 levels in thrombotic microangiopathy are scarce.

### IV. Influence of CXCL9 and CXCL10 on the prognosis of kidney transplant

The results of this study show that an increased concentration of CXCL9/cre and CXCL10/cre not only correlates with the result of the histological examination at that time, but also predicts the outcome of the graft regardless of the results of the histology results. According to our data, increased levels of CXCL9/cre and CXCL10/cre also increase the risk of end-stage graft failure by 5.16 and 3.25 times, respectively.

The associations of chemokines with the graft prognosis have also been evaluated by other authors. Among patients with low (<0.70 ng/mmol) CXCL10 levels, 95% were free of adverse outcomes (rejection, GFR decline >20%, or graft loss) at 5 years, while, among patients with high CXCL10 levels, only 78% did not experience adverse outcomes [97]. Data from other authors show that CXCL10/cre levels at 3 months after transplantation allowed the prediction of acute graft rejection independently of the results of the protocol biopsy performed at that time, whereas the cut-off value of CXCL10/cre determined by the authors was 2.79 ng/mmol [89]. Another publication showed that higher CXCL10 levels at 1 month after the transplantation was associated with a worse graft function at 6 months after the transplantation [130].

Publications on CXCL9/cre and the graft outcome are scarce. The CTOT study, which evaluated the value of CXCL9 in the diagnosis of renal transplant rejection, showed that low CXCL9 levels at 6 months after kidney transplantation showed a good graft prognosis (no risk of rejection or GFR decline) within 6–24 months after transplantation, and their negative prognostic value was 92.5–99.3% [96]. Our data showed that the prognostic value of CXCL9 was not inferior to the more widely analyzed chemokine CXCL10.

Interestingly, CXCL9/cre levels were associated with the recipient survival, and, at levels below 0.11 ng/mmol, none of the recipients experienced a fatal outcome. A trend towards a better recipient survival rate and lower CXCL10/cre levels was observed in the recipient group, but no significant difference from the group with increased CXCL10/cre concentrations was found.

#### V. Relationship of diCBCi with chemokines CXCL9 and CXCL10 and graft rejection

CXCL9/cre and CXCL10/cre values were directly correlated to the adaptation and genitothyroid ratio index values, but only the adaptation index values were significantly different between the normal and the increased CXCL9/cre and CXCL10/cre concentration groups. Also, only the adaptation index significantly differentiated histologically determined graft rejection from the normal or any other pathology, although the area under the curve value was inferior to the chemokine area under the curve values. Interestingly, the majority of transplant patients had adaptation index values lower than the general population normal values, while ‘normal’ and elevated adaptation index values were associated with graft rejection and other non-rejection-

related graft pathology. Also, even ‘too low’ but closer to normal adaptation index values were associated with graft rejection. Thus, it can be assumed that the assessment and norms of the adaptation index in transplant patients using maintenance immunosuppression should be different from the general population.

Since the adaptation index is calculated by dividing eosinophils by monocytes (assessed as a percentage), it is rational to analyze more deeply the relationship between immunosuppressants, rejection, and these blood cells. Immunosuppressants such as corticosteroids are known to decrease the number of blood eosinophils [137]. There are also data that eosinophilia can often be detected before the onset of lymphocyte-mediated graft rejection, and successful treatment of such rejection with corticosteroids reduces the amount of eosinophils in the blood [138, 139]. Other immunosuppressants also affect these blood cells: the calcineurin inhibitor tacrolimus reduces the amount of eosinophils in the blood by promoting their apoptosis [140], but has no significant clinical impact on the monocyte function; it only affects macrophage polarization [141].

However, it has been established that the absolute number of monocytes decreases after the transplantation, but the ability of some monocyte subtypes to produce cytokines, including interferon-gamma, may persist, and this smoldering source of inflammation may lead to the development of cellular rejection [142]. Thus, in summary, it can be stated that, under the influence of immunosuppressants, the amount of eosinophils in the blood decreases, which results in lower values of the adaptation index. If the effect of immunosuppressants decreases on eosinophils, this may indicate a lower immunosuppressive effect of immunosuppressants and an increasing risk of transplant rejection. Therefore, the normal limits of this index cannot be applied to the population of transplant recipients when interpreting the values of the adaptation index. A larger and more detailed analysis is needed to determine the optimal values of the adaptation index for transplanted patients. These values determine the lowest risk of transplant rejection and infectious complications.

It is likely that the most information about the optimal values of the adaptation index for a transplanted patient can be obtained by evaluating the dynamics of the adaptation index of the same patient and comparing it with the patient’s post-transplantation course: what index values are present in the case of the stable graft function, and what values are present during the development of rejection or the onset of an infectious disease.

## CONCLUSIONS

- Urinary levels of CXCL9/cre and CXCL10/cre were significantly higher in patients with biopsy-proven kidney transplant rejection and allowed to differentiate such patients from the patients with normal allograft histology. Urinary chemokines could not differentiate the type of rejection: TCMR or ABMR.
- CXCL9/cre and CXCL10/cre levels were higher with more pronounced interstitial inflammation (i), peritubular capillaritis (ptc) and vascular intima inflammation (v). Glomerulitis was significantly associated only with CXCL10/cre values.
- Urinary concentrations of CXCL9/cre and CXCL10/cre were significantly increased in polyoma BK virus nephropathy compared to cases of normal histology, but they did not differ from the increase in graft rejection.
- Elevated urinary levels of CXCL9/cre and CXCL10/cre were associated with worse kidney graft and recipient survival.
- Adaptation index (eosinophil to monocyte ratio) was significantly associated with increased urinary levels of CXCL9/cre and CXCL10/cre and kidney graft rejection.

## RECOMMENDATIONS

The results of this work confirm that the biomarkers CXCL9 and CXCL10 allow to distinguish those kidney transplant recipients with graft rejection from those with normal graft histology or other lesions unrelated to rejection. As urinary chemokine detection is a non-invasive, relatively simple test, it could be widely applied in the follow-up of kidney transplant recipients for routine urine chemokine testing: if no elevated urine chemokine levels are measured, such patients can avoid protocol biopsies, thus reducing the health care costs and decreasing the risks and discomfort of intervention to the patient. On the other hand, if the recipient's graft function is stable and an increased concentration of chemokines is detected in the urine, subclinical rejection of the kidney graft can be suspected, and thus a graft biopsy would be indicated for such a patient and, if rejection is confirmed, an early rejection therapy should be administered, thus preventing the deterioration of the graft function and the graft loss.

However, the concentration of CXCL9 and CXCL10 in urine can be increased in polyoma BK virus nephropathy of a transplanted kidney, and this increase does not differ from that in the case of transplant rejection; so,

differential diagnosis should be carried out for polyoma BK virus by BK virus DNA testing in urine or blood.

As CXCL9 and CXCL10 are early markers of graft injury, earlier than creatinine, which is routinely used to assess the graft function, they could be used to guide the dosing and administration of immunosuppression, for example, immunosuppression could be reduced in the presence of normal urinary chemokine concentrations, and, when these markers begin to increase, it allows to increase the doses of immunosuppressants. However, more data are needed to support such assumptions in a timely manner.

Another advantage of chemokine testing would be if the patient could perform the chemokine test at home, for the purpose of self-examination, similar to the point of care tests that are used to diagnose other conditions (infections, pregnancy). The development of such a test is already underway, and, in 2022, a group of German scientists published an article about an antibody-aptamer hybrid lateral flow test for CXCL9 detection; the sensitivity and specificity of this test reached 71% [101]. Such a test would allow patients to monitor the state of the transplant at home: if the test did not show an increase in chemokine, the patient could skip a visit to the nephrologist, which would provide more comfort for patients living far from the transplant center, ultimately saving time and money for both the health care facility and the patient. On the other hand, if the rapid chemokine test detects an increased concentration of the marker, the patient could go to the nephrologist in a timely and targeted manner and adjust the treatment in time, thus preserving the function of the graft as long as possible.

Thus, chemokines CXCL9 and CXCL10 would undoubtedly provide added value in the care of patients after kidney transplantation: their application could contribute to improving the survival of kidney transplants and the quality of life of the recipients.

The BoF indexes used in endobiogenic medicine have not been studied so far in the population of transplant patients who are constantly using immunosuppressive therapy. As a result, there were not enough data how to interpret the values of the indexes when a patient uses medications that affect the corticotropic axis. This study showed that it is not correct to apply the intervals of the normal values of the indexes based on the general population to the population of such patients, because values of the adaptation index below the normal but closer to normal values of the general population may indicate graft rejection. Since the present research is the first study of endobiogenic BoF indices in kidney transplant recipients, and as it involved a relatively heterogeneous group of transplanted patients, larger studies of

kidney transplant recipients are needed to determine the normal and pathologic index values in this population.

Since the indices examined in this work are calculated from the indicators of a general blood test, it is a test that does not require a lot of additional funds and is easily performed, while providing additional information to the doctor before deciding to order more detailed tests for a possible infection or transplant rejection, as well as when assessing the course of the disease or dosing immunosuppressants.

## 11. MOKSLINIAI STRAIPSNIAI ir PRANEŠIMAI DISERTACIJOS TEMA

### MOKSLINIAI STRAIPSNIAI

1. Mačionienė E, Simanavičius M, Vitkauskaitė M, Vickienė A, Staučė R, Vinikovas A, Miglinas M. Urinary Chemokines CXCL9 and CXCL10 Are Non-Invasive Biomarkers of Kidney Transplant Rejection. *Annals of Transplantation*. DOI: 10.12659/AOT.944762
2. Mačionienė E, Serapinas D, Miglinas M. Endobiogenic Biology of Function Indices in a Cohort of Kidney Transplant Recipients. *Medicina (Kaunas)*. 2024 Jun 20;60(6):1016. doi: 10.3390/medicina60061016. PMID: 38929633; PMCID: PMC11205680.

### PRANEŠIMAI

#### Žodiniai pranešimai:

1. 2018 10 05 „Transplant Rejection Biomarkers“. XIV Baltic Nephrology Conference. Talinas, Estija.
2. 2023 05 13 „Urinary Chemokines in Kidney Transplant Recipients“. Junge Niere konferencija Regensburg, Vokietija.
3. 2023 06 16 „Urinary CXCL9 and CXCL10 Levels and Kidney Transplant Injury“. ERA-EDTA kongresas. Milan, Italija.
4. 2023 09 20 „Evaluation of Urinary Chemokines CXCL9 and CXCL10 as biomarkers of kidney transplant rejection“. Life Science Baltics konferencija. Vilnius, Lietuva.

#### Stendiniai pranešimai:

1. 2023 09 15 „Urinary CXCL9 and CXCL10 in Kidney Transplant Recipients: Associations with Clinical and Histological Parameters“. Šiaurės šalių nefrologų draugijos kongresas. Reikjavikas, Islandija.
2. 2024 06 „Biology of Functions Indexes in a Population of Kidney Transplant Recipients“. Tarptautinė evoliucinės medicinos konferencija. Vilnius, Lietuva

## 12. GYVENIMO APRAŠYMAS

**Vardas ir pavardė:** Ernesta Mačionienė

**Gimimo vieta:** Vilnius, Lietuva.

**Veiklos sritis:** gydytoja nefrologė

### **Išsilavinimas:**

- Vidurinis: Vilniaus Antano Vienuolio gimnazija (2003).
- Aukštasis: Vilniaus universitetas medicinos fakultetas, Medicina (2009).
- Profesinė kvalifikacija: Vilniaus universitetas medicinos fakultetas, Nefrologijos rezidentūra (2014).

### **Darbo patirtis:**

2014 09 - dabar Vilniaus universitetas Medicinos fakultetas: asistentė/lektorė

2014 08 – dabar Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos: gydytoja nefrologė

2018 – 2024 -Trakų medicinos centras: gydytoja nefrologė

2014 -2021 Vilniaus Karoliniškių poliklinika: gydytoja nefrologė.

2014 – 2019 UAB Renumvita: gydytoja nefrologė

2014 – 2016 Dializės centras Renalvita: gydytoja nefrologė

2013 -2014 Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos: gydytoja asistentė

2011 12 – 2013 04 Baltijos Amerikos klinika: budinti gydytoja

2009 06 - 2010 09 Valstybinis patologijos centras: gydytoja asistentė

### **Draugijos:**

Europos nefrologų draugijos ERA EDTA narė.

Lietuvos inkstų fondo narė

Lietuvos nefrologų draugijos LNDTA narė.

Amerikos nefrologų draugijos ASN narė.

### **Stažuotės ir kursai:**

2018 m. Tarptautinė Baltijos šalių nefrologų konferencija, Talinas, Estija.

2022 05 Psichoneuroendokrinologijos kursai, LSMU.

2022 11 03- 06 Amerikos Nefrologų Draugijos (ASN) kongresas

“Kidney Week 2022”, Orlando, Florida (JAV)

2023 03 „Molekulinė medicina transplantacijoje“ mokymai Prahoje.

2023 06 ERA EDTA kongresas, Milanai, Italija

2023 09 Šiaurės nefrologų asociacijos kongresas, Reikjavikas, Islandija.  
 2024 03 Trombinių mikroangiopatijų mokymai, Madridas, Ispanija.  
 2024 05 23-26 ERA EDTA 61-asis kongresas, Stokholmas, Švedija.  
 2024 10 Desensitizacijos mokymai Amsterdame, Olandija.

## **Straipsniai**

1. Mačionienė E, Simanavičius M, Vitkauskaitė M, Vickienė A, Staučė R, Vinikovas A, Miglinas M. Urinary Chemokines CXCL9 and CXCL10 Are Non-Invasive Biomarkers of Kidney Transplant Rejection. *Ann Transplant*. 2024 Oct 15;29:e944762. doi: 10.12659/AOT.944762. PMID: 39402819; PMCID: PMC11490196.
2. Mačionienė E, Serapinas D, Miglinas M. Endobiogenic Biology of Function Indices in a Cohort of Kidney Transplant Recipients. *Medicina (Kaunas)*. 2024 Jun 20;60(6):1016. doi: 10.3390/medicina60061016. PMID: 38929633; PMCID: PMC11205680.
3. Zakauskienė U, Bratckoviene N, Macioniene E, Zabuliene L, Sukackiene D, Linkeviciute-Dumce A, Karosiene D, Banys V, Migline V, Utkus A, Miglinas M. Association of Urinary Sodium, Potassium, and the Sodium-to-Potassium Ratio with Impaired Kidney Function Assessed with 24-H Urine Analysis. *Nutrients*. 2024 Oct 7;16(19):3400. doi: 10.3390/nu16193400. PMID: 39408367; PMCID: PMC11478606.
4. Zakauskienė U, Macionienė E, Zabuliene L, Sukackienė D, Linkeviciute-Dumce A, Banys V, Bratckoviene N, Karosiene D, Slekiene V, Kontrimas V, Simanauskas K, Utkus A, Brazdziunaite D, Migline V, Makarskiene I, Zurlyte I, Rakovac I, Breda J, Cappuccio FP, Miglinas M. Sodium, potassium and iodine intake in an adult population of Lithuania. *Nutrients*. 2022 Sep 16;14(18):3817. doi: 10.3390/nu14183817. PMID: 36145201
5. Miglinas M, Ševčenko V, Račaitė A, Žakauskienė U, Vickienė A, Miglinė V, Wang W, Beaney T, Poulter NR, Macionienė E. May measurement month 2017-2019: an analysis of blood pressure screening results from Lithuania. *Eur Heart J Suppl*. 2022 Oct 7;24(Suppl F):F22-F24. doi: 10.1093/eurheartjsupp/suac043. eCollection 2022 Sep. PMID: 36225270
6. Vitkauskaitė, M.; Vinikovas, A.; Miglinas, M.; Rimševičius, L.; Čerkauskaitė, A.; Mačionienė, E.; Ašakienė, E. Complement Inhibitor Eculizumab in Thrombotic Microangiopathy: Single-center Case Series. *Clinical Case Reports* 2022, 10, doi:10.1002/ccr3.5573. PMID: 35317070; PMCID: PMC8922540.

7. Garam N, Cserhalmi M, Prohászka Z, Szilágyi Á, Veszeli N, Szabó E, Uzonyi B, Iliás A, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, Sunder-Plassmann G, Bajcsi D, Brunner J, Dumfarth A, Cejka D, Flaschberger S, Flögelova H, Haris Á, Hartmann Á, Heilos A, Mueller T, Rusai K, Arbeiter K, Hofer J, Jakab D, Sinkó M, Szigeti E, Bereczki C, Janko V, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Klenk N, Kóbor K, Kojc N, Knechtelsdorfer M, Laganovic M, Lungu AC, Meglic A, Rus R, Kersnik Levart T, Macioniene E, Miglinas M, Pawłowska A, Stompór T, Podracka L, Rudnicki M, Mayer G, Rysava R, Reiterova J, Saraga M, Seeman T, Zieg J, Sládková E, Stajic N, Szabó T, Capitanescu A, Stancu S, Tisljar M, Galesic K, Tislér A, Vainumäe I, Windpessl M, Zaoral T, Zlatanova G, Józsi M, Csuka D. FHR-5 Serum Levels and CFHR5 Genetic Variations in Patients With Immune Complex-Mediated Membranoproliferative Glomerulonephritis and C3-Glomerulopathy. *Front. Immunol.* 2021, 12, 720183, doi:10.3389/fimmu.2021.720183. PMID: 34566977; PMCID: PMC8461307.
8. Garam N, Prohászka Z, Szilágyi Á, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, Sunder-Plassmann G, Bajcsi D, Brunner J, Dumfarth A, Cejka D, Flaschberger S, Flögelova H, Haris Á, Hartmann Á, Heilos A, Mueller T, Rusai K, Arbeiter K, Hofer J, Jakab D, Sinkó M, Szigeti E, Bereczki C, Janko V, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Klenk N, Kóbor K, Kojc N, Knechtelsdorfer M, Laganovic M, Lungu AC, Meglic A, Rus R, Kersnik-Levart T, Macioniene E, Miglinas M, Pawłowska A, Stompór T, Podracka L, Rudnicki M, Mayer G, Rysava R, Reiterova J, Saraga M, Seeman T, Zieg J, Sládková E, Szabó T, Capitanescu A, Stancu S, Tisljar M, Galesic K, Tislér A, Vainumäe I, Windpessl M, Zaoral T, Zlatanova G, Csuka D. Validation of Distinct Pathogenic Patterns in a Cohort of Membranoproliferative Glomerulonephritis Patients by Cluster Analysis. *Clinical Kidney Journal* 2020, 13, 225–234, doi:10.1093/ckj/sfz073. PMID: 32296528; PMCID: PMC7147314.
9. Garam N, Prohászka Z, Szilágyi Á, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, Sunder-Plassmann G, Bajcsi D, Brunner J, Dumfarth A, Cejka D, Flaschberger S, Flögelova H, Haris Á, Hartmann Á, Heilos A, Mueller T, Rusai K, Arbeiter K, Hofer J, Jakab D, Sinkó M, Szigeti E, Bereczki C, Janko V, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Klenk N, Kóbor K, Kojc N, Knechtelsdorfer M, Laganovic M, Lungu AC, Meglic A, Rus R, Kersnik-Levart T, Macioniene E, Miglinas M, Pawłowska A, Stompór T, Podracka L, Rudnicki M, Mayer G, Romana Rysava, Reiterova J, Saraga M, Tomáš Seeman, Zieg J, Sládková E, Szabó T, Capitanescu A, Stancu S, Tisljar M, Galesic K, Tislér A, Vainumäe I, Windpessl M, Zaoral T, Zlatanova G,

- Csuka D. C4 Nephritic Factor in Patients with Immune-Complex-Mediated Membranoproliferative Glomerulonephritis and C3-Glomerulopathy. *Orphanet J Rare Dis* 2019, 14, 247, doi:10.1186/s13023-019-1237-8. PMID: 31703608; PMCID: PMC6839100.
10. Rimševičius, L.; Galkauskas, D.; Lavinskas, J.; Šestelinska, E.; Mačionienė, E.; Laučytė-Cibulskienė, A.; Rėkutė, S.; Miglinas, M. Gastric Antral Vascular Ectasia Should Not Be Overlooked in Erythropoietin Resistance: A Series of Case Reports. *AML* 2019, 25, 219–225, doi:10.6001/actamedica.v25i4.3932. PMID: 31308827; PMCID: PMC6591695
  11. Brazdziute E, Miglinas M, Gruodyte E, Priluckiene J, Tamosaitis A, Bumblyte IA, Kuzminskis V, Burbaickaja S, Sakalauskienė M, Jankauskienė A, Cerkauskienė R, Pundziene B, Laurinavicius A. Nationwide renal biopsy data in Lithuania 1994-2012. *Int Urol Nephrol*. 2015 Apr;47(4):655-62. doi: 10.1007/s11255-015-0927-y. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25686739.
  12. Brazdziute E, Laurinavicius A. Digital pathology evaluation of complement C4d component deposition in the kidney allograft biopsies is a useful tool to improve reproducibility of the scoring. *Diagn Pathol*. 2011 Mar 30;6 Suppl 1(Suppl 1):S5. doi: 10.1186/1746-1596-6-S1-S5. PMID: 21489200; PMCID: PMC3073223.

### 13. CURRICULUM VITAE

**Name and surname:** Ernesta Mačionienė

**Place of birth:** Vilnius, Lithuania.

**Specialization:** nephrologist

**Education:**

- Vilnius Antano Vienuolio Gymnasium (2003).
- Vilnius University, Faculty of Medicine, Medicine (2009).
- Vilnius University, Nephrology residency (2014).

**Work experience:**

2014 09 01- now Vilnius University, Faculty of Medicine: assistant/lector

2014 08 04 – now Vilnius University Hospital Santaros Klinikos: nephrologist.

2018 – 2024 -Trakai Medicine Center: nephrologist.

2014 -2021 Vilnius Karoliniškių out-patient clinic: nephrologist.

2014 – 2019 Dialysis center Renumvita: nephrologist

2014 – 2016 Dialysis center Renalvita: nephrologist

2013 – 2014 Vilnius University Hospital Santaros Klinikos: assistant.

2011– 2013 Baltic American Clinic: medicine doctor.

2009 06 - 2010 09 National Center of Pathology: assistant.

Lector in congresses organized by Lithuanian Kidney Foundation and Lithuanian Hypertension Society

**Societies:**

European Renal Association- European Dialysis and Transplantation Association (ERA EDTA) - member.

Lithuanian Kidney Foundation - member

Lithuanian Nephrology Dialysis and Transplantation Association (LNDTA) - member.

American Society of Nephrology (ASN) – member.

**Workshops:**

2018 International Baltic Nephrology Congress, Talin, Estonia.

2022 05 Psichoneuroendocrinology courses, LSMU.

2022 11 03- 06 ASN congress “Kidney Week 2022”, Orlando, Florida (USA)

2023 03 „Molecular Medicine in Transplantation“, Prague, Czech Republic.

2023 06 ERA EDTA congress, Milan, Italy

2023 09 Nordic Society of Nephrology, Reikjavik, Island.

2024 03 Trombotic microangiopathy courses, Madrid, Spain.

2024 05 23-26 ERA EDTA 61st congress, Stockholm, Sweden.

2024 10 Desensitization courses, Amsterdam, Netherlands.

### **Publications:**

1. Mačionienė E, Simanavičius M, Vitkauskaitė M, Vickienė A, Staučė R, Vinikovas A, Miglinas M. Urinary Chemokines CXCL9 and CXCL10 Are Non-Invasive Biomarkers of Kidney Transplant Rejection. *Ann Transplant*. 2024 Oct 15;29:e944762. doi: 10.12659/AOT.944762. PMID: 39402819; PMCID: PMC11490196.
2. Mačionienė E, Serapinas D, Miglinas M. Endobiogenic Biology of Function Indices in a Cohort of Kidney Transplant Recipients. *Medicina (Kaunas)*. 2024 Jun 20;60(6):1016. doi: 10.3390/medicina60061016. PMID: 38929633; PMCID: PMC11205680.
3. Zakauskienė U, Bratckoviene N, Macioniene E, Zabuliene L, Sukackiene D, Linkeviciute-Dumce A, Karosiene D, Banys V, Migline V, Utkus A, Miglinas M. Association of Urinary Sodium, Potassium, and the Sodium-to-Potassium Ratio with Impaired Kidney Function Assessed with 24-H Urine Analysis. *Nutrients*. 2024 Oct 7;16(19):3400. doi: 10.3390/nu16193400. PMID: 39408367; PMCID: PMC11478606.
4. Zakauskienė U, Macioniene E, Zabuliene L, Sukackiene D, Linkeviciute-Dumce A, Banys V, Bratckoviene N, Karosiene D, Slekiene V, Kontrimas V, Simanaukas K, Utkus A, Brazdziunaite D, Migline V, Makarskiene I, Zurlyte I, Rakovac I, Breda J, Cappuccio FP, Miglinas M. Sodium, potassium and iodine intake in an adult population of Lithuania. *Nutrients*. 2022 Sep 16;14(18):3817. doi: 10.3390/nu14183817. PMID: 36145201
5. Miglinas M, Ševčenko V, Račaitė A, Žakauskienė U, Vickienė A, Miglinė V, Wang W, Beaney T, Poulter NR, Macioniene E. May measurement month 2017-2019: an analysis of blood pressure screening results from Lithuania. *Eur Heart J Suppl*. 2022 Oct 7;24(Suppl F):F22-F24. doi: 10.1093/eurheartjsupp/suac043. eCollection 2022 Sep. PMID: 36225270

6. Vitkauskaitė, M.; Vinikovas, A.; Miglinas, M.; Rimševičius, L.; Čerkauskaitė, A.; Mačionienė, E.; Ašakienė, E. Complement Inhibitor Eculizumab in Thrombotic Microangiopathy: Single-center Case Series. *Clinical Case Reports* 2022, 10, doi:10.1002/ccr3.5573. PMID: 35317070; PMCID: PMC8922540.
7. Garam N, Cserhalmi M, Prohászka Z, Szilágyi Á, Veszeli N, Szabó E, Uzonyi B, Iliás A, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, Sunder-Plassmann G, Bajcsi D, Brunner J, Dumfarth A, Cejka D, Flaschberger S, Flögelova H, Haris Á, Hartmann Á, Heilos A, Mueller T, Rusai K, Arbeiter K, Hofer J, Jakab D, Sinkó M, Szigeti E, Bereczki C, Janko V, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Klenk N, Kóbor K, Kojc N, Knechtelsdorfer M, Laganovic M, Lungu AC, Meglic A, Rus R, Kersnik Levart T, Macioniene E, Miglinas M, Pawłowska A, Stompór T, Podracka L, Rudnicki M, Mayer G, Rysava R, Reiterova J, Saraga M, Seeman T, Zieg J, Sládková E, Stajic N, Szabó T, Capitanescu A, Stancu S, Tisljar M, Galesic K, Tislér A, Vainumäe I, Windpessl M, Zaoral T, Zlatanova G, Józsi M, Csuka D. FHR-5 Serum Levels and CFHR5 Genetic Variations in Patients With Immune Complex-Mediated Membranoproliferative Glomerulonephritis and C3-Glomerulopathy. *Front. Immunol.* 2021, 12, 720183, doi:10.3389/fimmu.2021.720183. PMID: 34566977; PMCID: PMC8461307.
8. Garam N, Prohászka Z, Szilágyi Á, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, Sunder-Plassmann G, Bajcsi D, Brunner J, Dumfarth A, Cejka D, Flaschberger S, Flögelova H, Haris Á, Hartmann Á, Heilos A, Mueller T, Rusai K, Arbeiter K, Hofer J, Jakab D, Sinkó M, Szigeti E, Bereczki C, Janko V, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Klenk N, Kóbor K, Kojc N, Knechtelsdorfer M, Laganovic M, Lungu AC, Meglic A, Rus R, Kersnik-Levart T, Macioniene E, Miglinas M, Pawłowska A, Stompór T, Podracka L, Rudnicki M, Mayer G, Rysava R, Reiterova J, Saraga M, Seeman T, Zieg J, Sládková E, Szabó T, Capitanescu A, Stancu S, Tisljar M, Galesic K, Tislér A, Vainumäe I, Windpessl M, Zaoral T, Zlatanova G, Csuka D. Validation of Distinct Pathogenic Patterns in a Cohort of Membranoproliferative Glomerulonephritis Patients by Cluster Analysis. *Clinical Kidney Journal* 2020, 13, 225–234, doi:10.1093/ckj/sfz073. PMID: 32296528; PMCID: PMC7147314.
9. Garam N, Prohászka Z, Szilágyi Á, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, Sunder-Plassmann G, Bajcsi D, Brunner J, Dumfarth A, Cejka D, Flaschberger S, Flögelova H, Haris Á, Hartmann Á, Heilos A, Mueller T, Rusai K, Arbeiter K, Hofer J, Jakab D, Sinkó M, Szigeti E, Bereczki C, Janko V, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Klenk N, Kóbor K, Kojc N,

- Knechtelsdorfer M, Laganovic M, Lungu AC, Meglic A, Rus R, Kersnik-Levart T, Macioniene E, Miglinas M, Pawłowska A, Stompór T, Podracka L, Rudnicki M, Mayer G, Romana Rysava, Reiterova J, Saraga M, Tomáš Seeman, Zieg J, Sládková E, Szabó T, Capitanescu A, Stancu S, Tisljar M, Galesic K, Tislér A, Vainumäe I, Windpessl M, Zaoral T, Zlatanova G, Csuka D. C4 Nephritic Factor in Patients with Immune-Complex-Mediated Membranoproliferative Glomerulonephritis and C3-Glomerulopathy. *Orphanet J Rare Dis* 2019, 14, 247, doi:10.1186/s13023-019-1237-8. PMID: 31703608; PMCID: PMC6839100.
10. Rimševičius, L.; Galkauskas, D.; Lavinskas, J.; Šestelinska, E.; Mačionienė, E.; Laučytė-Cibulskienė, A.; Rėkutė, S.; Miglinas, M. Gastric Antral Vascular Ectasia Should Not Be Overlooked in Erythropoietin Resistance: A Series of Case Reports. *AML* 2019, 25, 219–225, doi:10.6001/actamedica.v25i4.3932. PMID: 31308827; PMCID: PMC6591695
  11. Brazdziute E, Miglinas M, Gruodyte E, Priluckiene J, Tamosaitis A, Bumblyte IA, Kuzminskis V, Burbaickaja S, Sakalauskienė M, Jankauskienė A, Cerkauskienė R, Pundziene B, Laurinavicius A. Nationwide renal biopsy data in Lithuania 1994-2012. *Int Urol Nephrol*. 2015 Apr;47(4):655-62. doi: 10.1007/s11255-015-0927-y. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25686739.
  12. Brazdziute E, Laurinavicius A. Digital pathology evaluation of complement C4d component deposition in the kidney allograft biopsies is a useful tool to improve reproducibility of the scoring. *Diagn Pathol*. 2011 Mar 30;6 Suppl 1(Suppl 1):S5. doi: 10.1186/1746-1596-6-S1-S5. PMID: 21489200; PMCID: PMC3073223.

## 14. PRIEDAI

### LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ



#### VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, tel. (8 5) 268 7001, faks. (8 5) 272 8646, el. p. [info@cr.vu.lt](mailto:info@cr.vu.lt).

Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810.

Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8701, (8 5) 239 7800, faks. (8 5) 239 8705, el. p. [mf@mf.vu.lt](mailto:mf@mf.vu.lt)

#### VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. [rbtek@mf.vu.lt](mailto:rbtek@mf.vu.lt)

### LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2017-02-07 Nr.158200-17-901-409

Tyrimo pavadinimas:

**Virusinių ir imunologinių veiksnių, susijusių su inkstų veiklos sutrikimais ir inkstų transplantato atmetimo rizikos vertinimu, tyrimas**

|                                   |                                                                                                              |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Protokolo Nr.:                    | Vir-Nef                                                                                                      |
| Versija:                          | 2                                                                                                            |
| Data:                             | 2017-02-01                                                                                                   |
| Informuoto asmens sutikimo forma: |                                                                                                              |
| Versija:                          | 2                                                                                                            |
| Data:                             | 2017-02-01                                                                                                   |
| Pagrindinis tyrėjas               | <b>Marius Miglinas</b>                                                                                       |
| Įstaigos pavadinimas:             | VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santariškių klinikos<br>Nefrologijos centras<br>Santariškių g. 2, Vilnius |
| Adresas:                          |                                                                                                              |
| Pagrindinis tyrėjas:              | <b>Indrė Kučinskaitė-Kodžė</b>                                                                               |
| Įstaigos pavadinimas:             | Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras,<br>Biotechnologijos institutas<br>Saulėtekio al. 7, Vilnius    |
| Adresas:                          |                                                                                                              |
| Leidimas galioja iki:             | <b>2019-12-31</b>                                                                                            |

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2017/02, vykusio 2017 m. vasario 7 d. sprendimu).

Pirmininkas



Saulius Vosylius

## 15. PADĖKA

Noriu padėkoti savo darbo vadovui prof. Mariui Miglinui už suteiktą galimybę parengti disertacinį darbą, už sąlygas tobulėti bei plėsti savo žinias, nuolatinį palaikymą ir tikėjimą manimi.

Dėkoju nuostabiam VULSK Nefrologijos centro kolektyvui, slaugytojoms, gydytojams už visokeriopą palaikymą, pagalbą renkant pacientų mėginius ir puikią komandą dirbant klinikinį darbą.

Nuoširdžiai dėkoju savo studento praktikos vadovui prof. A. Laurinavičiui, įkvėpusiam gilintis į nefrologiją ir parodžiusiam kelią į mokslą.

Ačiū VU Gyvybės mokslų centro mokslininkams dr. Martynui Simanavičiui ir dr. Indrei Kučinskaitei-Kodzei už pagalbą atliekant chemokinių tyrimą mėginiuose.

Dėkoju disertacinio darbo recenzentams, kurių vertingos pastabos ir konsultacijos leido patobulinti disertacinį darbą.

Didžiausią padėką skiriu savo šeimai, ačiū už nuolatinį palaikymą, kantrybę, meilę ir dovanotą laiką kurti.

## 16. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Mačionienė E, Simanavičius M, Vitkauskaitė M, Vickienė A, Staučė R, Vinikovas A, Miglinas M. Urinary Chemokines CXCL9 and CXCL10 Are Non-Invasive Biomarkers of Kidney Transplant Rejection. *Ann Transplant*. 2024 Oct 15;29:e944762. doi: 10.12659/AOT.944762. PMID: 39402819; PMCID: PMC11490196.
2. Mačionienė E, Serapinas D, Miglinas M. Endobiogenic Biology of Function Indices in a Cohort of Kidney Transplant Recipients. *Medicina (Kaunas)*. 2024 Jun 20;60(6):1016. doi: 10.3390/medicina60061016. PMID: 38929633; PMCID: PMC11205680.

Received: 2024.04.08  
Accepted: 2024.06.28  
Available online: 2024.07.17  
Published: 2024.10.15

## Urinary Chemokines CXCL9 and CXCL10 Are Non-Invasive Biomarkers of Kidney Transplant Rejection

Authors' Contribution:  
Study Design A  
Data Collection B  
Statistical Analysis C  
Data Interpretation D  
Manuscript Preparation E  
Literature Search F  
Funds Collection G

ABCEFG 1 **Ernesta Mačionienė**   
BE 2 **Martynas Šimanavičius**  
BC 1 **Monika Vitkauskaitė**  
B 1 **Alvita Vickienė**  
B 3 **Roberta Staučė**  
B 3 **Artūras Vinikovas**  
ADEFG 1 **Marius Miglinas**

1 Institute of Clinical Medicine, Gastroenterology, Nephro-Urology and Surgery Clinic, Faculty of Medicine, Vilnius University, Vilnius, Lithuania  
2 Institute of Biotechnology, Life Sciences Center, Vilnius University, Vilnius, Lithuania  
3 Nephrology Center, Vilnius University Hospital Santaros Clinics, Vilnius, Lithuania

**Corresponding Author:** Ernesta Mačionienė, e-mail: [ernesta.macioniene@santa.lt](mailto:ernesta.macioniene@santa.lt)  
**Financial support:** Vilnius University  
**Conflict of interest:** None declared

**Background:** Rejection is the main cause of kidney allograft failure, and kidney biopsy is the criterion standard method to diagnose it. However, non-invasive techniques to detect kidney transplant rejection are necessary. This study aimed to evaluate urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 as potential biomarkers of kidney transplant rejection and to analyze chemokine association with allograft prognosis.

**Material/Methods:** We collected 117 urine samples from kidney transplant recipients undergoing allograft biopsy. CXCL9 and CXCL10 levels were measured by ELISA and the ratio to urine creatinine was calculated. Histology and other clinical data were collected from medical records.

**Results:** The diagnostic performance of urinary CXCL9/cre in discriminating rejection from all other histological groups showed an ROC AUC value of 0.728 (95% CI 0.632-0.824,  $p < 0.001$ ), and a cut-off value 0.11 ng/mmol had the best sensitivity (76.9%) and specificity (73.1%). The ability of CXCL10/cre to discriminate transplant rejection from all other histological groups had ROC AUC value 0.73 (95% CI 0.63-0.84,  $P < 0.001$ ), the cut-off value 0.42 ng/mmol with best sensitivity (71.4%) and specificity (84.6%). CXCL9 and CXCL10 levels were also increased in patients with polyoma BK virus, recurrent AA amyloidosis, and thrombotic microangiopathy. Patients with higher CXCL9/cre ( $\geq 0.11$  ng/mmol) and CXCL10/cre ( $\geq 0.42$  ng/mmol) levels were at increased risk of transplant progression to ESRD (HR 3.25, 95% CI=1.27-8.36,  $P=0.01$ ), irrespective of serum creatinine at the time of biopsy.

**Conclusions:** Urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre were able to distinguish between patients with transplant rejection and those without rejection. High levels of urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre were associated with worse allograft survival.

**Keywords:** Biomarkers • Chemokines, CXC • Graft Rejection • Kidney Transplantation

**Full-text PDF:** <https://www.annalsoftransplantation.com/abstract/index/idArt/944762>

 3824  2  6  39



Publisher's note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher

## Introduction

The diagnosis of renal transplant rejection is evolving towards non-invasive diagnostic methods to early suspect or rule out renal transplant rejection, avoid unnecessary graft biopsy, or help monitor the level of immunosuppression to adjust the administration of immunosuppressive drugs accordingly. Much progress has already been made in the search for potential biomarkers of kidney transplant rejection in blood, urine, and kidney biopsy material, analyzing proteins, RNA, and gene expression.

Among the potential biomarkers are chemokines, which can be detected in both blood and urine. Chemokines are chemotactic cytokines involved in various biological processes, such as angiogenesis, hematopoiesis, and migration of leukocytes and other cells. The most promising chemokine biomarkers in kidney transplantation are chemokine 9 (CXCL9) and chemokine 10 (CXCL10).

CXCL9 (monokine induced by IFN- $\gamma$ ) and CXCL10 (IFN- $\gamma$ -inducible protein 10, IP-10) act through their shared receptor CXCR3 [1,2] and can attract NK cells, mononuclear cells, specifically activated T cells, and B cells [3,4]. CXCL9 is a critical mediator of primed T cell trafficking in transplant models. In animal models, CXCL9 has also been shown to stimulate cytokine production by recruited T cells and promote Th1 cell proliferation through induction of the transcription factors T-bet and ROR $\gamma$ T and production of type-1 cytokines (IL-2, TNF, and IFN- $\gamma$ ) [5].

CXCL10 is constitutively expressed in stromal cells of lymphoid organs (spleen, thymus, and lymph nodes), suggesting a potential role in T cell development and effector functions. CXCL10 is a biomarker for tubulointerstitial kidney allograft inflammation of any etiology [6], but CXCL10 is also increased in antibody-mediated rejection with higher "g", and "ptc" Banff scores [7]. In animal transplant models, CXCL9 and CXCL10 levels rapidly rise following reperfusion and during early rejection of the liver, kidney, and heart [8-10].

In kidney transplant recipients with T cell-mediated rejection (TCMR) and antibody-mediated rejection (ABMR), the urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are increased compared with patients without rejection [11-13]. Treatment of allograft rejection reduces the level of urinary CXCL10 [14,15]. Subclinical allograft rejection correlates with CXCL10 but not CXCL9 levels [16]. It is also known that elevated urinary CXCL10 can predict kidney transplant rejection, but the ability of serum CXCL10 to assess the risk of allograft rejection remains controversial due to clinical confounding factors [17,18]. Notably, urine and serum CXCL10 are not specific for rejection because they can increase in patients with polyoma BK virus infection and urinary tract infection, while serum but not urinary

CXCL10 increases in patients with cytomegalovirus infection [12,15,16,19,20].

We aimed to evaluate urinary CXCL9 and CXCL10 as potential biomarkers of kidney transplant rejection and to analyze their association with graft prognosis.

## Material and Methods

### Study Description and Collection of Samples

A total of 117 kidney transplant recipients undergoing surveillance or clinically-indicated kidney biopsy at Vilnius University Hospital Santaros Klinikos were included in the study in 2019-2022. Midstream urine samples were obtained before the biopsy and stored at -20°C to measure chemokines and creatinine, which were done regularly after collecting a group of samples. Patient clinical data were collected from a prospectively-completed electronic patient medical data system. The main patient characteristics are presented in Table 1.

Kidney biopsy cores were obtained using an 18-gauge needle under ultrasound guidance. Biopsies were evaluated in a single center by an experienced pathologist and reported using the Banff scheme, applying the most up-to-date criteria at the time of reporting [21,22]. For further analysis, biopsies were divided into 4 distinct groups: normal histology, rejection (ABMR), TCMR, mixed rejection), polyoma BK nephropathy, and other histology (global glomerulosclerosis, recurrent glomerulonephritis, thrombotic microangiopathy without rejection, calcineurin toxicity induced lesions, amyloidosis, interstitial nephritis).

Kidney transplant recipients received standard induction immunosuppressive therapy: basiliximab for moderate immunological risk and thymoglobulin for high immunological risk recipients. Maintenance immunosuppressive therapy mostly consisted of tacrolimus or cyclosporine (the latter used by earlier-transplanted patients), mofetil mycophenolate, and methylprednisolone.

Patients with biopsy-proven rejection were treated according to the histological phenotype and severity. Briefly, TCMR episodes were treated with steroids and severe clinical TCMR patients received thymoglobulin infusions. ABMR was mostly treated with plasmapheresis and intravenous immunoglobulins  $\pm$  rituximab. The study complies with all regulations, and informed consent was obtained from the participants. The experiments were conducted according to established ethics guidelines and the Declaration of Helsinki. This study was approved by the Bioethics Committee of the Vilnius Region (approval No. 158200-17-901-409).

**Table 1.** Patient (n=117) characteristics.

| Patient characteristics               |                                   | Value          |
|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Gender                                | Male, %                           | 63.2           |
|                                       | Female, %                         | 36.8           |
| Age                                   | Average age, years                | 43±13          |
| eGFR at biopsy                        | ml/min/1.73 m <sup>2</sup>        | 39±18          |
| Biopsy time after transplantation     | Median months [IQR]               | 20.0 [6-96]    |
| Transplant number                     | First transplant (% of patients)  | 76.1           |
|                                       | Second transplant (% of patients) | 18.8           |
|                                       | Third transplant (% of patients)  | 4.3            |
| Total life years on immunosuppression | Median [IQR]                      | 4.3 [1.0-11.0] |
| Hemoglobin at biopsy                  | g/l                               | 115.8±19.8     |
| BMI                                   | kg/m <sup>2</sup>                 | 24.7±4.8       |
| Serum urea at biopsy                  | mmol/l                            | 20.4±12.6      |
| Biopsy result (% of cases)            | Normal histology, %               | 22.2           |
|                                       | ABMR, %                           | 21.4           |
|                                       | TCMR, %                           | 7.7            |
|                                       | Mixed rejection, %                | 8.8            |
|                                       | BK virus nephropathy, %           | 4.4            |
|                                       | Other abnormalities, %            | 35.9           |
| Immunosuppression                     | Tacrolimus, %                     | 66.7           |
|                                       | Cyclosporine, %                   | 25.6           |
|                                       | Mofetil mycophenolate, %          | 93.2           |
|                                       | Methylprednisolone, %             | 92.3           |
|                                       | Azathioprine, %                   | 2.6            |
|                                       | Sirolimus, %                      | 7.7            |
| Immunosuppressant levels              | Tacrolimus ng/ml                  | 6.57±3.78      |
|                                       | Cyclosporine ng/ml                | 84.74±27.15    |
|                                       | Sirolimus, ng/ml                  | 0.83±0.65      |

### Chemokine Detection

Urinary CXCL9 and CXCL10 measurements were performed retrospectively on midstream urine samples (collected before kidney biopsy and stored at -20°C without any additives) with “Human MIG (CXCL9) Mini ABTS ELISA Development Kit” (Peprotech, Catalog #900-M87) and “Human IP-10 (CXCL10) Mini ABTS ELISA Development Kit” (Peprotech, Catalog #900-M39), respectively. All procedures were carried out as recommended by the manufacturer using ELISA reagents provided in the “ABTS ELISA Buffer Kit” (Peprotech, Catalog #900-K00). Briefly, for CXCL9 measurement, ELISA plate wells were

coated overnight at room temperature with 1 µg/mL Rabbit Anti-Human MIG (CXCL9) antibody, and for the CXCL10 measurement, wells were coated overnight at room temperature with 0.5 µg/mL Rabbit Anti-Human IP-10 (CXCL10) antibody, washed, and then blocked. Each urine sample (100 µL per well) and ELISA kit standards were tested in triplicate by incubating for 2 h at room temperature. After washing, biotinylated Rabbit Anti-Human MIG (CXCL9) or IP-10 (CXCL10) secondary polyclonal antibody was added at 1 µg/mL or 0.25 µg/mL, respectively, and incubated for 2 h at room temperature. Plates were then washed, and incubated with avidin-horseradish peroxidase conjugate for 30 min at room temperature. After

washing, the signal was developed with ABTS substrate by incubating for 25 min for CXCL9 detection and for 20 min for CXCL10 detection. Optical density (OD) was read at 405 nm with wavelength correction set at 650 nm using a "Multiskan GO" spectrophotometer (Thermo Scientific). CXCL9 and CXCL10 concentrations were calculated from standard curves using the 4-parameter logistic model curve fit in "OriginPro 8" (OriginLab) software. Detection ranges were 16-1000 pg/mL for both CXCL9 and CXCL10. Urine samples with measured ODs exceeding the OD of the 1000 pg/mL standards were diluted and retested. To correct for different urine dilutions, the excretion of urine proteins was normalized to urine creatinine (ie, ng protein/mmol creatinine).

### Statistical Analysis

Continuous variables were presented as mean±standard deviation, or median (interquartile range) according to the type of data. The normality of quantitative data was tested by the Kolmogorov-Smirnov test. We used the *t* test and Mann-Whitney *U* test to compare continuous variables with normal and skewed distributions, respectively. The Spearman's rank correlation coefficient and unsupervised hierarchical clustering analysis with logarithmic values of CXCL9 concentration normalized to creatinine concentrations (CXCL9/cre) and CXCL10/cre were used to explore the relationship between urinary CXCL9/cre, CXCL10/cre and Banff scores.

The ability of urinary CXCL10/cre and CXCL9/cre to detect transplant rejection was analyzed by constructing receiver operating characteristic (ROC) curves. The Youden index was estimated from the ROC curve to calculate the optimal threshold value. These cut-off values were used to calculate the sensitivity and specificity of urinary CXCL10/cre for diagnosis of the rejection. A multivariate Cox proportional regression analysis was performed to analyze the association of CXCL/cre levels with graft survival. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with SPSS 29.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

## Results

### CXCL9/cre and CXCL10/cre Levels Are Increased in Patients with Rejection

The median of CXCL9/cre levels in the rejection group (5.55 [IQR 1.04-15.88] ng/mmol) was significantly higher than in the normal histology group (0.00 [IQR 0.00-0.89] ng/mmol) and the other histology group (1.83 [IQR 0.00-9.54] ng/mmol), *P*<0.05 (Figure 1).

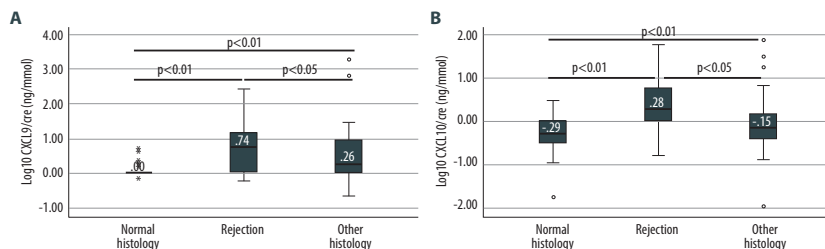
The diagnostic performance of CXCL9/cre in discriminating transplant rejection from normal histology was estimated by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The ROC area under the curve (AUC) value was 0.857 (95% CI 0.771-0.943, *P*<0.001). The cut-off value of CXCL9/cre that showed the best sensitivity (70.5%) and specificity (92.3%) was 2.45 ng/mmol. We further tested CXCL9/cre diagnostic performance in discriminating rejection from all other histological groups (including normal histology and other histology abnormalities like recurrent glomerulonephritis, and glomerulosclerosis). The ROC AUC value was 0.728 (95% CI 0.632-0.824, *P*<0.001), the cut-off value of 0.11 ng/mmol resulted in the best sensitivity (76.9%), and specificity (73.1%) (Figure 2). The negative predictive value was 82.5%, while the positive predictive value was 48.1%.

The median of CXCL10/cre levels in the rejection group (1.89 [IQR 0.57-5.89] ng/mmol) was significantly higher than in the normal histology group (0.18 [IQR 0.00-0.37] ng/mmol) and the other histology group (0.64 [IQR 0.22-1.47] ng/mmol), *P*<0.05. The ROC AUC value for CXCL10/cre in discriminating transplant rejection from normal histology was 0.827 (95% CI 0.729-0.925, *P*<0.001). The cut-off value of CXCL10/cre with the best sensitivity (75.6%) and specificity (88.5%) was 0.65 ng/mmol. The ability of CXCL10/cre to discriminate transplant rejection from all other histological groups had an ROC AUC value 0.73 (95% CI 0.63-0.84, *P*<0.001). The cut-off value with the best sensitivity (71.4%) and specificity (84.6%) was 0.42 ng/mmol. The negative predictive value was 78.7%, while the positive predictive value was 48.6%.

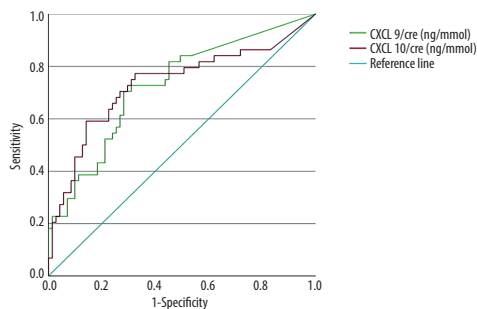
### CXCL/cre Ability to Discriminate between ABMR and TCMR

TCMR and mixed rejection cases were excluded from further analysis, leaving only cases with pure ABMR, normal histology, and other histology lesions (without rejection). CXCL9/cre ability to discriminate ABMR demonstrated an ROC AUC value of 0.73 (95% CI 0.62-0.84, *p*<0.001). The CXCL10/cre ROC AUC value was higher, at 0.75 (95% CI 0.63-0.87, *P*<0.001).

To further test the chemokine's ability to detect TCMR, we excluded cases with ABMR and mixed rejection from further analysis. There were 9 cases of TCMR and 73 cases of normal or other histology. ROC analysis of CXCL9/cre and CXCL10/cre showed AUC values of 0.67 (95% CI 0.47-0.86, *P*>0.05) and 0.61 (95% CI 0.35-0.86, *P*>0.05), respectively, revealing a poor ability to identify pure TCMR from normal or other histology lesions. We removed all polyoma BK cases (*n*=5) from further analysis, but this did not improve CXCL9/cre and CXCL10/cre values significantly (CXCL9/cre ROC AUC 0.68 and CXCL10/cre ROC AUC 0.63, but *P*>0.05).



**Figure 1.** The logarithmic values of CXCL9/cre (A) and CXCL10/cre (B) levels in normal histology, rejection and other histology (eg, global glomerulosclerosis, recurrent glomerulonephritis, amyloidosis) cases. Both chemokines are significantly increased in rejection groups compared to other groups. The figure was created with SPSS 29.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).



**Figure 2.** ROC curve for CXCL9/cre and CXCL10/cre at biopsy for discriminating rejection from all biopsies (eg, normal and with other histological abnormalities – global glomerulosclerosis, recurrent glomerulonephritis). The figure was created with SPSS 29.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

### CXCL/cre in Polyoma BK Nephropathy Cases

From 117 kidney transplant recipients, 5 (4.3%) had biopsy-proven BK nephropathy. The median CXCL9/cre and CXCL10/cre levels were 9.91 [IQR 3.58-24.49] ng/mmol and 4.94 [IQR 1.10-18.88] ng/mmol, respectively. Levels of both chemokines were significantly higher in BK nephropathy compared to normal histology ( $P < 0.05$ ) but did not differ significantly from the rejection group.

### Cases with Low CXCL/cre and Biopsy-Proven Transplant Rejection

A total of 7 patients with biopsy-proven kidney transplant rejection had CXCL9/cre levels  $< 0.11$  ng/mmol (subsequently referred to as “low CXCL9/cre”), while 10 patients with biopsy-proven kidney transplant rejection had CXCL10/cre levels lower than 0.42 ng/mmol (subsequently referred to as “low CXCL10/cre”) – CXCL “false-negative” cases. However, none of those patients reached an ESRD of 11.5 during the median

follow-up period [IQR 1.75-47.7], while in cases with increased CXCL9/cre and increased CXCL10/cre levels, 41.2% and 36.8% of patients reached ESKD, respectively.

In 40 cases with CXCL9/cre  $< 0.11$  ng/mmol (the cut-off value suggested by ROC), 82.5% did not have rejection on histology, but there were 3 cases of ABMR, 2 cases of T cell-mediated rejection, and 2 cases of mixed rejection, and those diagnoses may have been missed without a kidney biopsy.

In 47 cases with CXCL10/cre  $< 0.42$  ng/mmol (the cut-off value with best sensitivity and specificity), 78.7% of cases did not have rejection, but 5 cases of ABMR, 3 cases of TCMR, and 2 cases of mixed rejection may have been missed without a biopsy.

Using a combination of CXCL9/cre and CXCL10/cre with higher than cut-off values as an indication for kidney biopsy, 3 cases of ABMR, 2 cases of TCMR, and only 1 case of mixed rejection would have been missed without a biopsy.

**Table 2.** Spearman correlation between CXCL/cre levels and Banff scores.

|            |     | g      | cg    | mm    | t    | ptc    | i      | ci   | ct   | v    | cv    | ah    |
|------------|-----|--------|-------|-------|------|--------|--------|------|------|------|-------|-------|
| CXCL9/cre  | rho | 0.24   | 0.17  | -0.07 | 0.08 | 0.39   | 0.31   | 0.13 | 0.08 | 0.19 | 0.02  | -0.01 |
|            | p   | 0.01   | 0.08  | 0.45  | 0.42 | <0.001 | <0.001 | 0.19 | 0.42 | 0.05 | 0.84  | 0.94  |
| CXCL10/cre | rho | 0.32   | 0.18  | 0.02  | 0.24 | 0.41   | 0.36   | 0.05 | 0.06 | 0.22 | -0.02 | -0.01 |
|            | p   | <0.001 | 0.048 | 0.82  | 0.01 | <0.001 | <0.001 | 0.58 | 0.53 | 0.02 | 0.84  | 0.89  |

**CXCL/cre Levels Correlation to Banff Scores**

The logarithm of urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre levels were correlated to all Banff scores (Table 2). Glomerulitis (g), peritubular capillaritis (ptc), and inflammation (i) lesions were significantly correlated with CXCL9/cre and CXCL10/cre levels, whereas chronic glomerulopathy (cg), tubulitis (t), and vascular lesions (v) had a significant correlation only with CXCL10/cre level. Unsupervised hierarchical cluster analysis (Figure 3) revealed that CXCL9/cre and CXCL10/cre were highly associated with Banff scores t, i, and v.

CXCL9/cre and CXCL10/cre levels were significantly higher in cases with higher scores of i and ptc (Figure 4). Tubulitis score t0 was defined as tubulitis-negative, while t1, t2, and t3 scores were defined as tubulitis-positive. CXCL9/cre and CXCL10/cre levels were higher in tubulitis-positive patients – the median CXCL9/cre level was 1.45 ng/mmol [IQR 0.00-6.00 ng/mmol] in t0 compared to 2.94 ng/mmol [IQR 0.00-11.85 ng/mmol] in the t1-3 group ( $P<0.01$ ). The median CXCL10/cre level was 0.51 ng/mmol [IQR 0.17-1.82 ng/mmol] in t0 compared to 1.26 ng/mmol [IQR 0.17-3.93 ng/mmol] in the t1-3 group ( $P<0.05$ ). There was a tendency towards higher levels of CXCL9/cre and CXCL10/cre in higher scores of g and v as well as higher CXCL9/cre in increased interstitial fibrosis (ci) cases, although the difference was not statistically significant.

**CXCL in Other Histology Groups**

Urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre were measured in patients with other histological diagnoses – diffuse glomerulosclerosis (n=17), thrombotic microangiopathy without rejection (n=3), recurrent IgA nephropathy (n=3), interstitial nephritis (n=3), calcineurin inhibitor (CNI) toxicity induced lesions (n=8), and AA amyloidosis (n=1). CXCL9/cre and CXCL10/cre were increased in cases with thrombotic microangiopathy and cases with amyloidosis, and, to a lesser extent, in cases with interstitial nephritis, while in glomerulosclerosis, CXCL levels remained low in patients with recurrent IgA nephropathy and CNI toxicity (Figure 5).

**CXCL/cre Levels and Time After Transplantation**

To determine if CXCL/cre levels differ depending on the time to rejection after transplantation, patients with biopsy-proven transplant rejection were divided into 2 groups: patients with biopsy taken <12 months (n=29) and >12 months (n=13) after transplantation. CXCL9/cre and CXCL10/cre levels did not differ significantly between these groups.

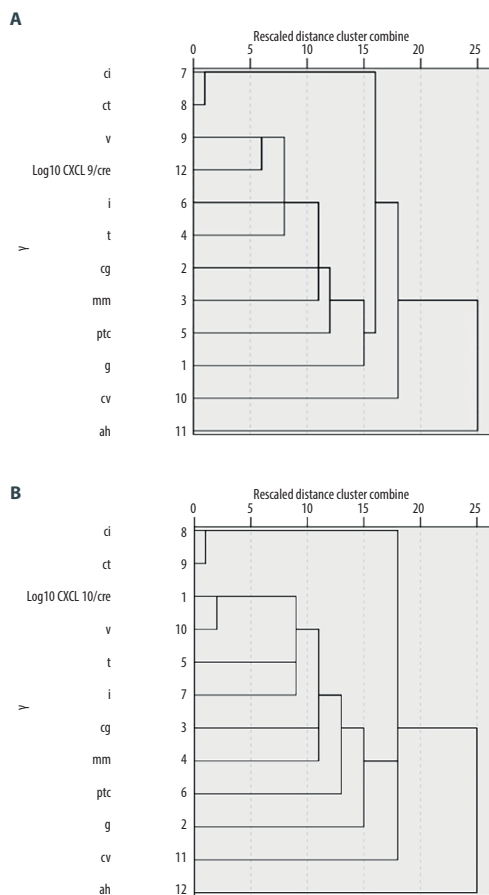
**CXCL/cre and Transplant Survival**

The association of CXCL9/cre and CXCL10/cre with transplant survival was investigated using multivariate Cox proportional hazards regression. Patients with higher CXCL9/cre ( $\geq 0.11$  ng/mmol) were significantly associated with transplant progression to ESRD (HR 5.16, 95%CI 1.85-14.42,  $P<0.01$ ), irrespective of other covariates like patient age, sex, serum creatinine levels, and histological diagnosis of rejection. We found that 12.5% of patients with low CXCL9/cre started dialysis compared to 40.3% of patients with high CXCL9/cre ( $P<0.05$ ) during the median follow-up of 49.5 months [IQR 15.5-67.0] in the low CXCL9/cre group and 11.0 months [IQR 3.0-23.5] in the high CXCL9/cre group.

Patients with higher CXCL10/cre ( $\geq 0.42$  ng/mmol) were significantly associated with transplant progression to ESRD (HR 3.25, 95%CI 1.27-8.36,  $P=0.01$ ), irrespective of the above-mentioned covariates. Dialysis was started by 12.8% of patients with low CXCL10/cre compared to 42.9% of patients with high CXCL10/cre ( $P<0.05$ ). Kaplan-Meier curves of graft survival are presented in Figure 6.

**Discussion**

Despite significant achievements in immunosuppressive therapies and kidney transplant recipient care, allograft rejection remains the main cause of kidney graft failure [23]. Early diagnosis and therapy can improve transplant prognosis [24], and development of accurate non-invasive diagnostic tools is essential for better allograft care.

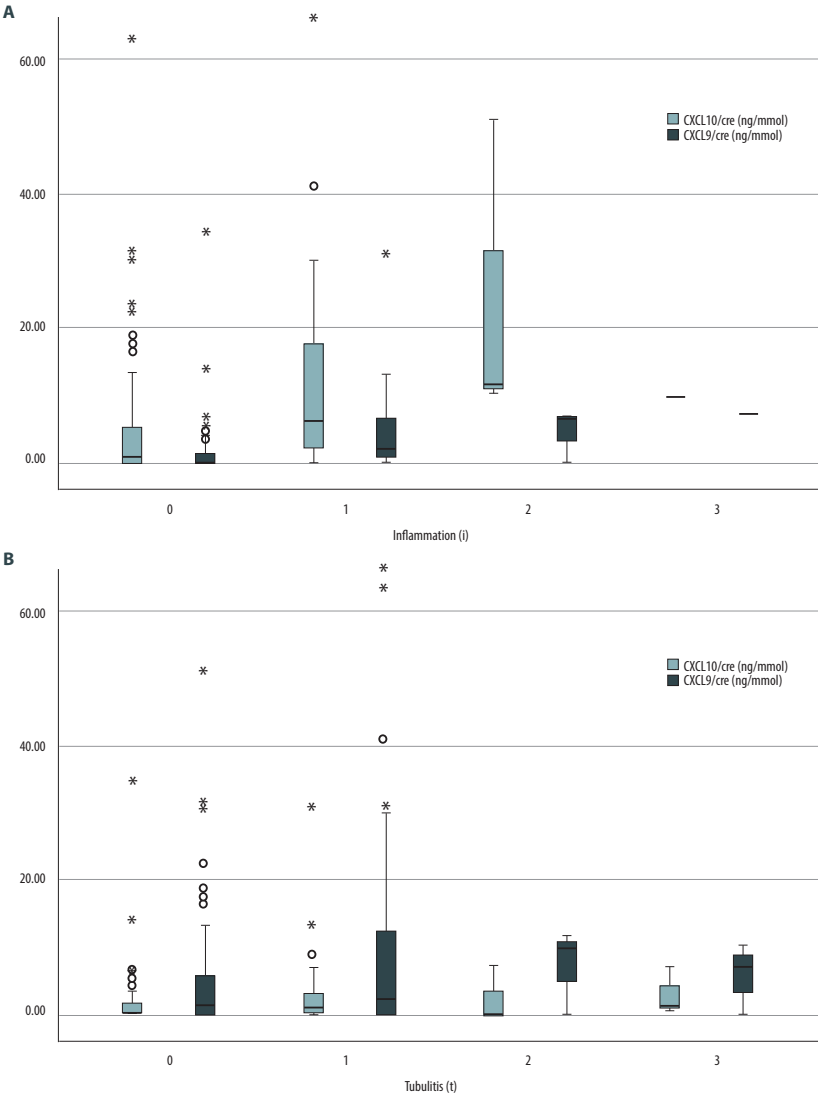


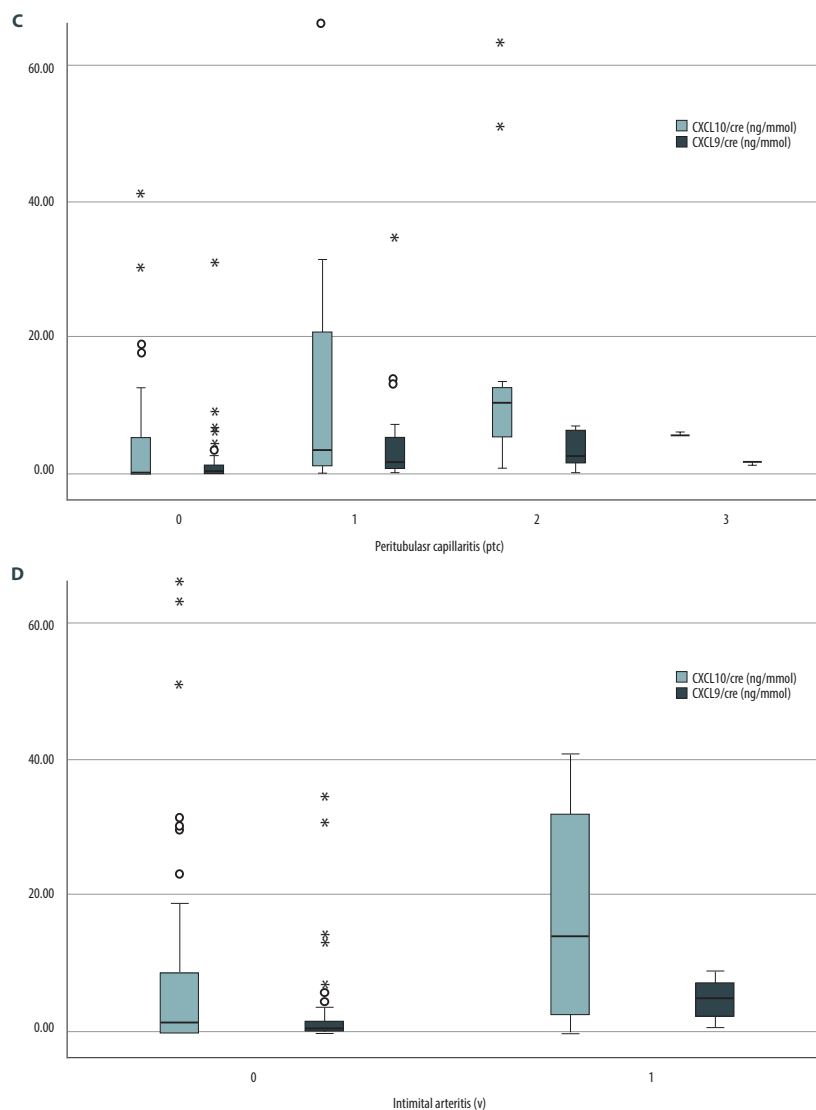
**Figure 3.** Dendrogram representation of unsupervised hierarchical cluster analysis of Banff scores and urinary CXCL9/cre (A) and CXCL10/cre (B). The figure was created with SPSS 29.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

This study demonstrated that urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre can distinguish between kidney transplant recipients with and without biopsy-proved graft rejection, which is consistent with previously published data [12,16,25,26].

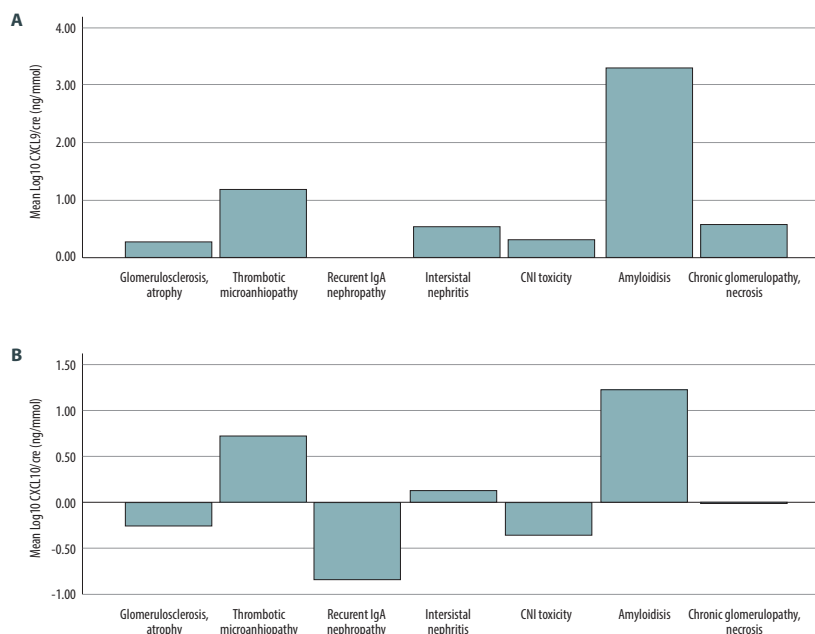
There were slight differences in optimal chemokine cut-off values detected in our study compared to other reports. We used a CXCL10 cut-off value of 0.42 ng/mmol, while another study suggested the optimal cut-off of 1.535 ng/mmol for biopsy decision in subclinical pathologies and 2.586 ng/mmol

for clinical pathologies, reducing surveillance and indication biopsy rate by 61% and 64%, respectively [6]. However, that study analyzed separate histology lesions (inflammation, tubulitis, vascular lesions), while our study evaluated CXCL diagnostic properties based on final histology entities according to the Banff classification system. Other authors found CXCL10 sensitivity 72% and specificity 71-73% in discriminating rejectors and non-rejectors with the optimal CXCL10/cre cut-off 0.43 ng/mmol [14,27]. These results are very similar to our study findings.





**Figure 4.** Boxplots representing increasing CXCL9/cre and CXCL10/cre levels in the higher Banff scores of inflammation (A), tubulitis (B), peritubular capillaritis (C) and intimal arteritis (D). The figure was created with SPSS 29.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

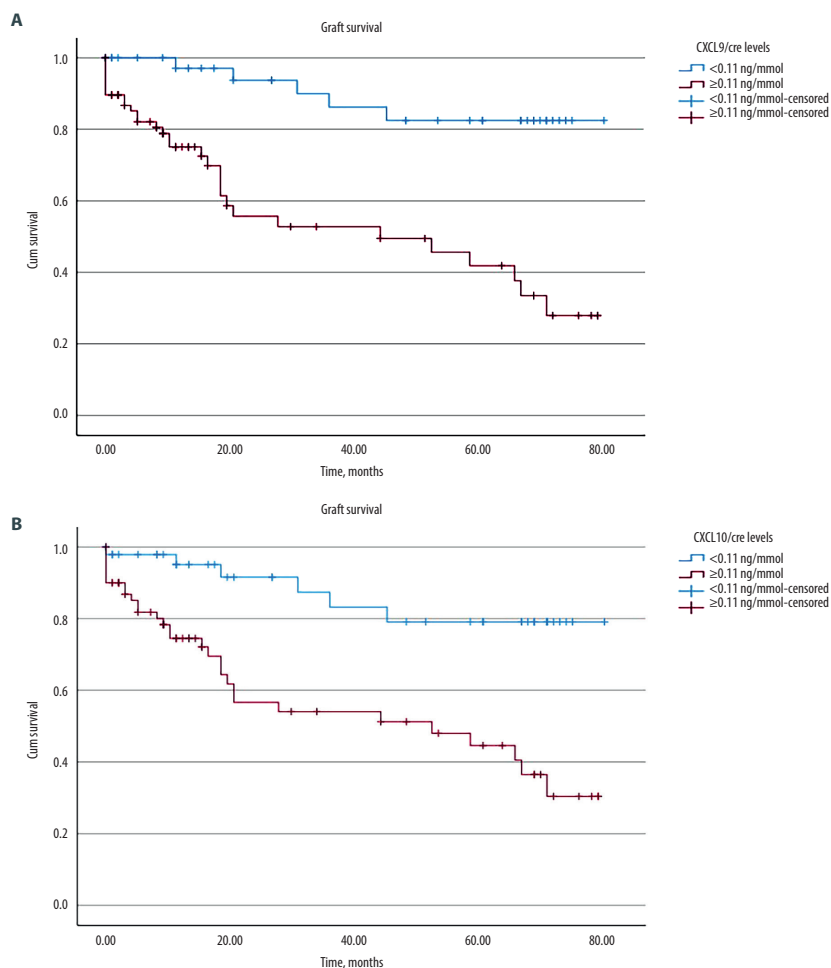


**Figure 5.** The means of Log10CXCL9/cre (A) and Log10CXCL10/cre (B) levels in cases with other histology abnormalities, no rejection. The figure was created with SPSS 29.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

There were some discrepancies between our study results and other publications about the association of CXCL with different Banff scores. Our data showed that both chemokines were highly associated with Banff scores t and i. This agrees with other studies [11,28] and can be explained by the fact that chemokines reflect inflammatory damage of the tubular compartment, irrespective of etiology [29]. Arnau et al found ptc, g, and cg scores to be associated with CXCL10/cre, while Ho et al found that CXCL10 was elevated with patients with higher ptc but not g scores [16]. Our Spearman correlation analysis showed both chemokines were associated with ptc and i, representing acute inflammatory lesions within a graft. CXCL10/cre was also associated with v lesion, while Ho et al showed that CXCL10 was increased in microvascular compartment injury but not in cases of isolated vascular lesions [16]. We found no association between chemokines and chronic graft lesions such as cv, but CXCL10/cre was significantly correlated with cg, which is consistent with the findings of Arnau et al [7].

Treatment of allograft rejection is different in cases with TCMR and ABMR; therefore, it is necessary to discriminate those types of rejection [30]. However, current data show that chemokines are unable to discriminate between these 2 types of rejection but distinguish well both types of rejection from normal histology patients. Ho et al found CXCL10 had an AUC of 0.81 (95% CI, 0.74-0.88) for detecting TCMR [31], and Ciftci et al showed that early posttransplant increase of CXCL9 and CXCL10 predicts TCMR and the time of rejection [26]. However, our data showed a poor ability of CXCL9/cre and CXCL10/cre to detect TCMR, possibly due to the small sample size in the TCMR group (we had only 9 cases of TCMR, while Ho et al analyzed 71 cases of mild to severe TCMR).

Another study showed that urinary CXCL10 had good discrimination ability for AbMR (AUC-ROC 0.760,  $P=0.001$ ) [7]. Our data showed quite similar results – the CXCL10/cre AUC-ROC was 0.75.



**Figure 6.** Kidney graft survival (time from kidney biopsy to initiation of dialysis) of patients with low and high levels of CXCL9/cre (A) and CXCL10/cre (B). The figure was created with SPSS 29.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

The CTOT-01 consortium determined urinary CXCL9 protein positive predictive value for acute rejection as 67%, whereas the negative predictive value was 92%, and found that low 6-month urinary CXCL9 protein identified patients without subclinical allograft injury and who were most likely to maintain stable kidney function [25]. Our data showed lower CXCL9/cre positive and negative predictive values – 48.1% and 82.5%, respectively.

With the use of urinary CXCL9 and CXCL10 biomarkers, both types of rejection are well distinguished from patients without rejection; therefore, these cytokines can be utilized to monitor kidney transplant recipients in a non-invasive manner. Minkowski demonstrated that in asymptomatic kidney transplant recipients, a urinary CXCL10-guided strategy would have reduced surveillance biopsies at 3 and 6 months by 61% [6]. In patients with graft dysfunction, the CXCL10-guided strategy would have reduced the number of indication biopsies by 64%. However, kidney biopsy should always be considered when allograft dysfunction with a high probability of rejection is present.

However, CXCL9 and CXCL10 are insufficient as the sole means of diagnosing kidney transplant rejection as they lack specificity and their levels can be higher in cases of viral or bacterial infections. Levels of CXCL9 and CXCL10 in urine were found to be substantially higher in patients with BKPyVAN compared to control subjects, including those with ABMR [32]. Our data confirmed that BK nephropathy cases had higher CXCL9/cre and CXCL10/cre levels compared to normal histology cases, but did not differ from CXCL levels in rejection cases.

To the best of our knowledge, little data is available about urinary CXCL9 and CXCL10 levels in transplant recipients with various recurrent native kidney diseases. Although our group of patients with recurrent kidney disease was very small, we found that both chemokines were much higher in patients with AA amyloidosis and thrombotic microangiopathy, which was mainly atypical hemolytic-uremic syndrome. Both diseases are associated with increased inflammatory response and cytokine production [33,34]. In patients with marked nephrosclerotic lesions, recurrent IgA nephropathy, and CNl toxicity, CXCL9 and CXCL10 levels remained low, demonstrating a different mechanism of kidney injury. These findings are interesting and more research should be done in the area of recurrent glomerulonephritis and chemokines.

An important advantage of CXCL9 and CXCL10 is that they can show rejection earlier than other currently used biomarkers. Observational studies demonstrate that CXCL10 rises prior to serum creatinine and decreases after treatment of rejection [12,35,36]. Moreover, chemokines can predict graft prognosis and stratify patients into a high and low risk of rejection. Our

study evaluated dialysis-free graft survival and revealed better graft survival in patients with lower CXCL9/cre and CXCL10/cre levels irrespective of serum creatinine at the time of biopsy. Interestingly, low CXCL/cre levels predicted better graft survival irrespective of the presence of acute rejection in kidney biopsy. Patients with low CXCL or CXCL10 levels and biopsy-proven kidney transplant rejection had a better prognosis than patients with rejection and high levels of chemokines – none of the “rejectors” with low levels of chemokines reached end-stage renal disease during the follow-up period. It has been reported that low 6-month CXCL10 (<0.70 ng/mmol) is associated with a 95% endpoint-free (no rejection, no GFR reduction >20%, no graft loss) 5-year survival compared to 78% with high 6-month CXCL10 [37]. Rabant et al showed that CXCL10/cre at 3 months after transplantation predicted acute rejection independent of concomitant protocol biopsy results, but they used a CXCL10/cre cut-off value of 2.79 ng/mmol [15].

Our study has some limitations. First, we had donor-specific antibody data only for a limited number of patients; therefore, all kidney transplant ABMR diagnoses were based only on allograft biopsy histology lesions. To calculate the accuracy of CXCL9 and CXCL10 levels as biomarkers of transplant rejection, we regarded kidney biopsy as the criterion standard, but some of the Banff scores (eg, pct) have inter-pathologist agreement of 0.52. ptc [38]. Therefore, it would be rational to employ digital image analysis for a more objective and reproducible quantitative evaluation of Banff scores [39]. The second limitation is the relatively small sample size in different types of graft rejection and BK nephropathy, limiting the ability to detect significant differences in CXCL level profile in particular types of rejection.

Despite the above-mentioned limitations, this study provides valuable insights into the potential of both chemokines, CXCL9 and CXCL10, to detect kidney transplant rejection, confirming the results of previous studies and providing additional information about CXCL9 and CXCL10 levels in patients with non-rejection histology lesions. Our study also adds substantial information about the relationship of CXCL/cre levels with overall graft survival, showing CXCL9/cre and CXCL10/cre are independent predictors of graft loss.

## Conclusions

This study confirmed previous findings that urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre levels distinguish patients with transplant rejection from those without it. Low levels of urinary CXCL9/cre and CXCL10/cre were associated with better allograft prognosis. Our data supplement findings about CXCL9 and CXCL10 in relation to Banff scores—both chemokines were significantly increased in higher scores of inflammation, tubulitis, and

peritubular capillaritis. Moreover, we found that CXCL9 and CXCL10 were significantly higher in patients with polyoma BK virus infection and in those with AA amyloidosis and thrombotic microangiopathy.

## Declaration of Figure's Authenticity

All figures submitted have been created by the authors, who confirm that the images are original with no duplication and have not been previously published in whole or in part.

## References:

- Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, et al. Role of CXCL9/CXCR3 chemokine biology during pathogenesis of acute lung allograft rejection. *J Immunol*. 2003;171(9):4844-52
- Loetscher M, Loetscher P, Brass N, et al. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: Regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol*. 1998;28(11):3696-705
- Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, et al. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med*. 1993;177(6):1809-14
- García-López MA, Sánchez-Madrid F, Rodríguez-Frade JM, et al. CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: Expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab Invest*. 2001;81(3):409-18
- Janes S. Encyclopedia of respiratory medicine; 2<sup>nd</sup> ed.; Elsevier Science & Technology: San Diego, 2021; ISBN 978-0-08-102724-0
- Hirt-Minkowski P, Amico P, Ho J, et al. Detection of clinical and subclinical tubulo-interstitial inflammation by the urinary CXCL10 chemokine in a real-life setting. *Am J Transplant*. 2012;12(7):1811-23
- Arnau A, Benito-Hernández A, Ramos-Barrón MA, et al. Urinary C-X-C Motif chemokine 10 is related to acute graft lesions secondary to T cell- and antibody-mediated damage. *Ann Transplant*. 2021;26:e929491
- Barker CE, Ali S, O'Boyle G, Kirby JA. Transplantation and inflammation: Implications for the modification of chemokine function. *Immunology*. 2014;143(2):138-45
- Fahmy NM, Yamani MH, Starling RC, et al. Chemokine and receptor-gene expression during early and late acute rejection episodes in human cardiac allografts. *Transplantation*. 2003;75(12):2044-47
- Fahmy NM, Yamani MH, Starling RC, et al. Chemokine and chemokine receptor gene expression indicates acute rejection of human cardiac transplants. *Transplantation*. 2003;75(1):72-78
- Rabant M, Amrouche L, Lebreton X, et al. Urinary C-X-C Motif chemokine 10 independently improves the noninvasive diagnosis of antibody-mediated kidney allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(11):2840-51
- Jackson JA, Kim EJ, Begley B, et al. Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection. *Am J Transplant*. 2011;11(10):2228-34
- Blydt-Hansen TD, Sharma A, Gibson IW, et al. Validity and utility of urinary CXCL10/Cr immune monitoring in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2021;21(4):1545-55
- Millán O, Budde K, Sommerer C, et al. Urinary miR-155-5p and CXCL10 as prognostic and predictive biomarkers of rejection, graft outcome and treatment response in kidney transplantation. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(12):2636-50
- Rabant M, Amrouche L, Morin L, et al. Early low urinary CXCL9 and CXCL10 might predict immunological quiescence in clinically and histologically stable kidney recipients. *Am J Transplant*. 2016;16(6):1868-81
- Ho J, Schaub S, Wiebe C, et al. Urinary CXCL10 chemokine is associated with alloimmune and virus compartment-specific renal allograft inflammation. *Transplantation*. 2018;102(3):521-29
- Lazzeri E, Rotondi M, Mazzinghi B, et al. High CXCL10 expression in rejected kidneys and predictive role of pretransplant serum CXCL10 for acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2005;79(9):1215-20
- Heidt S, Shankar S, Muthusamy AS, et al. Pretransplant serum CXCL9 and CXCL10 levels fail to predict acute rejection in kidney transplant recipients receiving induction therapy. *Transplantation*. 2011;91(8):e59-61
- Tinel C, Devresse A, Vermorel A, et al. Development and validation of an optimized integrative model using urinary chemokines for noninvasive diagnosis of acute allograft rejection. *Am J Transplant*. 2020;20(12):3462-76
- Millán O, Rovira J, Guirado L, et al. Advantages of plasmatic CXCL-10 as a prognostic and diagnostic biomarker for the risk of rejection and subclinical rejection in kidney transplantation. *Clin Immunol*. 2021;229:108792
- Loupy A, Haas M, Roufosse C, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2020;20(9):2318-31
- Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant*. 2018;18(2):293-307
- Parajuli S, Aziz F, Garg N, et al. Histopathological characteristics and causes of kidney graft failure in the current era of immunosuppression. *World J Transplant*. 2019;9(6):123-33
- Lamarque C, Côté JM, Sénécal L, Cardinal H. Efficacy of acute cellular rejection treatment according to Banff Score in kidney transplant recipients: A systematic review. *Transplant Direct*. 2016;2(12):e115
- Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, et al; COT-01 consortium. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant*. 2013;13(10):2634-44
- Ciftci HS, Tefik T, Savran MK, et al. Urinary CXCL9 and CXCL10 levels and acute renal graft rejection. *Int J Organ Transplant Med*. 2019;10(2):53-63
- Raza A, Firasat S, Khaliq S, et al. The association of urinary interferon-gamma inducible protein-10 (IP10/CXCL10) levels with kidney allograft rejection. *Inflamm Res*. 2017;66(5):425-32
- Arnau A, Benito-Hernández A, Ramos-Barrón MA, et al. Urinary C-X-C Motif chemokine 10 is related to acute graft lesions secondary to T cell- and antibody-mediated damage. *Ann Transplant*. 2021;26:e929491
- Anders HJ, Viehauer V, Schlöndorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int*. 2003;63(2):401-15
- Alasfar S, Kodali L, Schinstock CA. Current therapies in kidney transplant rejection. *J Clin Med*. 2023;12(15):4927
- Ho J, Sharma A, Mandal R, et al. Detecting renal allograft inflammation using quantitative urine metabolomics and CXCL10. *Transplant Direct*. 2016;2(6):e78
- Mayer KA, Omic H, Weseslindtner L, et al. Levels of donor-derived cell-free DNA and chemokines in BK polyomavirus-associated nephropathy. *Clin Transplant*. 2022;36(11):e14785
- Ramos MV, Ruggieri M, Panek AC, et al. Association of haemolytic uraemic syndrome with dysregulation of chemokine receptor expression in circulating monocytes. *Clin Sci (Lond)*. 2015;129(3):235-44
- De Buck M, Gouwuy M, Wang JM, et al. The cytokine-serum amyloid A-chemokine network. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;30:55-69
- Matz M, Beyer J, Wunsch D, et al. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int*. 2006;69(9):1683-90
- Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, et al; Clinical Trials in Organ Transplantation 04 (COT-04) Study Investigators. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med*. 2013;369(1):20-31
- Hirt-Minkowski P, Ho J, Gao A, et al. Prediction of long-term renal allograft outcome by early urinary CXCL10 chemokine levels. *Transplant Direct*. 2015;1(8):e31
- Delsante M, Maggiore U, Levi J, et al. Microvascular inflammation in renal allograft biopsies assessed by endothelial and leukocyte co-immunostain: A retrospective study on reproducibility and clinical/prognostic correlates. *Transp Int*. 2019;32(3):300-12
- Agudo-Domínguez E, Cabrera-Pérez R, Suarez-Benjumeda A, et al. Computer-assisted definition of the inflammatory infiltrates in patients with different categories of Banff kidney allograft rejection. *Front Immunol*. 2019;10:2605

## Article

# Endobiogenic Biology of Function Indices in a Cohort of Kidney Transplant Recipients

Ernesta Mačionienė <sup>1,\*</sup>, Danielius Serapinas <sup>2</sup> and Marius Miglinas <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gastroenterology, Nephrourology and Surgery Clinic, Faculty of Medicine, Vilnius University, LT03101 Vilnius, Lithuania; marius.miglinas@santa.lt

<sup>2</sup> Department of Family Medicine, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, LT44307 Kaunas, Lithuania; danielius.serapinas@ismuni.lt

\* Correspondence: ernesta.macioniene@santa.lt

**Abstract:** *Background and Objectives:* Endobiogeny is a global systems approach to human biology based on the concept that the endocrine system manages the metabolism. Biology of function (BoF) indices are diagnostic tools in endobiogenic medicine that reflect the action of the endocrine system on the cells and the metabolic activity of an organism. Kidney transplant recipients are a very specific patient population due to their constant use of immunosuppressive agents such as steroids and anamnesis of chronic kidney disease. The aim of this study was to assess the tendencies of endobiogenic BoF indices in a kidney transplant recipient population and to determine the relationship between BoF index values and histology-proven kidney transplant rejection. *Materials and Methods:* A total of 117 kidney transplant recipients undergoing surveillance or indication allograft biopsy were included in this study. Endobiogenic BoF indices were calculated from complete blood count tests taken before the kidney biopsy. Histology samples were evaluated by an experienced pathologist according to the Banff classification system. Clinical and follow-up data were collected from an electronic patient medical record system. *Results:* Overall, <35% of the patients had BoF index values assumed to be normal, according to the general population data. Additionally, >50% of the patients had lower-than-normal adaptation, leucocyte mobilization, genital, and adjusted genital ratio indices, while the Cata-Ana, genito-thyroid ratio, adrenal gland, and cortisol indices were increased in >50% of the transplant recipients. The adaptation index was significantly higher in patients with biopsy-proven transplant rejection and demonstrated an AUC value of 0.649 (95%CI 0.540–0.759) for discriminating rejectors from patients without transplant rejection. *Conclusions:* Most of the kidney transplant recipients had abnormal BoF index values, reflecting increased corticotropic effects on their cells. The adaptation index distinguished patients with biopsy-proven transplant rejection from those without it.

**Keywords:** kidney transplant; transplant rejection; endobiogeny; biology of function index



**Citation:** Mačionienė, E.; Serapinas, D.; Miglinas, M. Endobiogenic Biology of Function Indices in a Cohort of Kidney Transplant Recipients. *Medicina* **2024**, *60*, 1016. <https://doi.org/10.3390/medicina60061016>

Academic Editor: Ronald Castellino

Received: 8 April 2024

Revised: 9 June 2024

Accepted: 14 June 2024

Published: 20 June 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Kidney transplantation is one of the most effective methods of renal replacement therapy in patients with end-stage renal disease (ESRD) [1,2]. After receiving a kidney transplant, patients have to take combined immunosuppressive therapy to avoid allograft rejection and maintain the function of the transplanted kidney [3–5]. There are some risks associated with constant immunosuppression, such as various bacterial, fungal, or viral infections, opportunistic infections, cancer, and metabolic complications. Therefore, an optimal balance between over- and under-immunosuppression must be maintained [6–10].

In the context of kidney transplantation, there are several diagnostic methods and biomarkers to predict and diagnose kidney transplant rejection or to monitor transplant function [11]. Kidney transplant rejection can be suspected when non-specific biomarkers such as serum creatinine or proteinuria levels increase, and rejection is diagnosed through

kidney biopsy when characteristic histological abnormalities are present according to the Banff classification criteria [12,13]. Donor-specific antibodies are a biomarker of antibody-mediated transplant rejection. Moreover, there are more biomarkers, such as donor-derived cell-free DNA and the urinary chemokines CXCL9 and CXCL10, but none of them are highly specific to rejection as they may be increased in cases of viral infections, other sources of inflammation, and so on [14–18]. There are some biomarkers that can be used to evaluate the level of immunosuppression, including the concentrations of serum calcineurin inhibitors, pharmacogenetic biomarkers, or torque teno virus levels, providing guidance for immunosuppression [19,20]. However, there are still challenges associated with maintaining an optimal level of immunosuppression in individual patients, prolonging graft survival as long as possible, and avoiding the complications of over-immunosuppression throughout the patient's life.

Endobiogeny is a global systems approach to human biology and is based on the concept that the endocrine system manages the metabolism, resulting in biomarkers that reflect the functional achievement of specific aspects of the metabolism [21]. In endobiogeny, biology of function (BoF) indices are used to assess and monitor the functional balance of various systems within the body [22]. Direct indices are calculated from basic blood test results (e.g., the complete blood count with its differential) and various serum tests (e.g., those for electrolytes or lactate dehydrogenase), while indirect indices are calculated using patented software (Pub. No. US 2016/0132655 A1) by indexing various biomarkers and direct indices against each other [23]. BoF indices reflect the activity of different endocrine axes (corticotropic, gonadotropic, thyrotropic, and somatotropic), and can be used as tools to understand the nature of the disease and implement a holistic approach for individual patients.

Kidney transplant recipients are a very specific population of patients due to their prolonged use of immunosuppressive agents, history of long-lasting chronic kidney disease and, in most cases, a history of dialysis therapy before kidney transplantation [24]. All of these factors undoubtedly affect the patient's endocrine system and immune response [25–27].

In the existing literature, certain BoF indices have been analyzed in patients with myocardial infarction, COVID-19 infection, or heart failure [28–30]; however, we could not find any data about BoF indices in a kidney transplant recipient population. Therefore, the aim of this study was to calculate some of the BoF indices in kidney transplant recipients, enabling the analysis of the relationship between the BoF indices and biopsy-proven transplant rejection.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Description and Patient Population

A total of 117 randomly selected kidney transplant recipients admitted to the nephrology unit at Vilnius University Hospital Santaros Klinikos in 2017–2023 for a transplant biopsy were included in this study. The patient clinical data were collected retrospectively from an electronic patient medical data system. The laboratory test data included the complete blood count, biochemistry, immunosuppressive agent serum concentrations before kidney biopsy, and the serum creatinine level data both before biopsy and at follow-up (1, 3, and 6 months after transplantation and the last known follow-up). Kidney biopsies were evaluated at one center by an experienced pathologist and reported using the Banff scheme, applying the most up-to-date criteria at the time of reporting [12]. For further analysis, the biopsies were divided into three distinct groups: normal histology, rejection (antibody-mediated rejection (ABMR), T-cell-mediated rejection (TCMR), or mixed rejection), and other histology (global glomerulosclerosis, recurrent glomerulonephritis, thrombotic microangiopathy without rejection, calcineurin inhibitor toxicity-induced lesions, amyloidosis, interstitial nephritis, or BK virus nephritis).

The kidney transplant recipients received standard induction immunosuppressive therapy: basiliximab for moderate immunological risk and thymoglobulin for recipients with high immunological risk. Maintenance immunosuppressive therapy mostly consisted

of tacrolimus or cyclosporine (the latter was used by earlier transplant patients), mycophenolate mofetil, and methylprednisolone. Patients with biopsy-proven rejection were treated according to the histological phenotype and severity. Briefly, TCMR episodes were treated with steroids, and severe clinical TCMR patients received thymoglobulin infusions. ABMR was mostly treated with plasmapheresis and intravenous immunoglobulins +/- rituximab. This study complied with all regulations, and informed consent was obtained from the participants. The experiments were conducted according to established ethical guidelines.

## 2.2. Statistical Analysis

Continuous variables are presented as mean  $\pm$  standard deviation or median [interquartile range], according to the type of data. The normality of the quantitative data was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. The Student's *t*-test and the Wilcoxon Signed Rank test were applied to compare continuous variables with normal and skewed distributions, respectively. The Spearman's rank correlation analysis was performed, and an unsupervised hierarchical clustering analysis was conducted to identify patient groups with similar BoF indices to explore their relationship with allograft outcomes. The ability of BoF indices to discriminate transplant rejection was analyzed using receiver operating characteristic (ROC) curves. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with SPSS 29.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

## 2.3. BoF Indices

The BoF indices were calculated using formulas in the field of endobiogenic medicine [31]. A list of the indices that we calculated for kidney transplant recipients and a short explanation of these indices, according to the theory of endobiogeny, is provided as follows:

The Catabolism/Anabolism (Cata-Ana) index expresses the relative catabolic activity in relation to that of anabolic activity within the scheme of the global metabolism of the organism [31]. It is calculated from the ratios of neutrophils, lymphocytes, red blood cells (RBCs), and white blood cells (WBCs).

The adaptation index is the ratio of eosinophils to monocytes, which reflects the relative activity of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on cortisol in relation to follicle-stimulating hormone (FSH) activity on estrogen during the adaptation response. Eosinophils vary similarly to ACTH and are inhibited by cortisol through sequestration in the spleen and lungs [32]. Monocytes vary similarly to FSH stimulation and are inhibited by estrogens [33,34].

The cortisol index reflects the activity of cortisol. It does not directly indicate the concentration of cortisol in the blood but, instead, reflects the activity and effect of cortisol on cells. The formula for this index is based on the observation that cortisol increases erythrocytes, leukocytes, neutrophils, and monocytes, while diminishing lymphocytes, eosinophils, and the eosinophil/monocyte ratio [35–38]. The cortisol index formula includes the percentage of neutrophils, lymphocytes, eosinophils, and monocytes, as well as the absolute numbers of red blood cells and white blood cells (in thousands).

The adrenal gland index is an indirect index, calculated from the genito-thyroid ratio and genital ratio, which expresses the level of activity of the adrenal cortex [39].

The genital ratio index reflects the activity of androgens over estrogens and is calculated as the ratio of RBCs/(WBCs  $\times$  1000), according to the hypothesis that RBCs are a biomarker of the functional role of androgens in the metabolism and WBCs are a biomarker of the effects of estrogens on tissues [22].

The leukocyte mobilization index (LMI) evaluates the role of alpha-sympathetic activity in immediate adaptation [39]. A high LMI indicates that the alpha-sympathetic nervous system deliberates leukocytes more from splanchnic circulation than hepatic circulation. If the index is low, leukocytes are solicited more from perihepatic circulation than splanchnic circulation, indicating a tendency toward the *de novo* production of leukocytes from the bone marrow rather than liberation from the splanchnic reserve. The lower the index,

the more dysfunctional the response to aggression. Its formula includes WBCs, platelets, hemoglobin, and neutrophils.

The platelet mobilization index (PMI) formula includes platelets and red blood cells. The PMI expresses the adaptative liberating capacity of platelets sequestered in splanchnic versus splenic reservoirs. An elevated PMI indicates acute stress when the effects of adrenaline are augmented, favoring splanchnic demargination. A low PMI reflects a relative insufficiency of adrenaline activity in adaptation [39].

The starter index is calculated as the ratio of LMI to PMI and expresses the relative predominance of glucose mobilization to start the adaptation response of glucagon relative to adrenaline. This index evaluates the autonomic vs. endocrine and splanchnic vs. splenic pathways involved in starting the adaptation response. A high starter index indicates that glucagon for glucose mobilization from the liver is more effective than the effect of adrenaline [31].

The adjusted genital ratio index is an indirect index calculated as the ratio of the genital ratio index to the starter index [39]. It evaluates the general global predominance of androgens in relationship to that of estrogens on tissue in acute adaptation.

The genito-thyroid (GT) ratio index is the ratio of neutrophils (%) to lymphocytes (%), which expresses the relative activity of the gonads in relationship to that of the thyroid [39]. A high GT ratio indicates a greater likelihood of the thyrotropic axis soliciting inflammation to aid in catabolism; therefore, it is an indicator of systemic inflammation and increased risk of morbidity. A low GT ratio indicates a weak adaptive response of the thyroid.

The thyroid-releasing hormone (TRH) reactivation index is calculated as the ratio of monocytes (%) to lymphocytes (%). A high TRH reactivation index indicates the degree of disadaptation of the organism and reflects the level of reactivation of the thyrotropic axis by the alpha-sympathetic system [39].

### 3. Results

#### 3.1. Patient Characteristics and BoF Index Values

This study included 117 randomly selected kidney transplant recipients. Kidney biopsy and blood tests for BoF index calculation were performed at a median of 20 months after kidney transplantation, with 4.3 life years on immunosuppression overall (including immunosuppression used for previous transplants or autoimmune native kidney disease). Furthermore, 23.1% of patients had a second or third kidney transplant, and 37.9% of cases presented histological signs of allograft rejection. The main characteristics of our study population are provided in Table 1.

**Table 1.** Patient characteristics ( $n = 117$ ).

|                                       |                                        |                |
|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------|
| Gender                                | Male, $n$ (%)                          | 74 (63.2)      |
|                                       | Female, $n$ %                          | 43 (36.8)      |
| Age                                   | Average age, years                     | $43 \pm 13$    |
| eGFR at biopsy *                      | mL/min/1.73 m <sup>2</sup>             | $39 \pm 18$    |
| Biopsy time after transplantation     | Median months [IQR]                    | 20.0 [6–96]    |
|                                       | First transplant: $n$ (%) of patients  | 90 (76.9)      |
|                                       | Second transplant: $n$ (%) of patients | 22 (18.8)      |
| Number of transplantations            | Third transplant: $n$ (%) of patients  | 5 (4.3)        |
|                                       |                                        |                |
| Total life years on immunosuppression | Median [IQR]                           | 4.3 [1.0–11.0] |

**Table 1.** *Cont.*

|                                         |                                   |               |
|-----------------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| Hemoglobin at biopsy                    | g/L                               | 115.8 ± 19.8  |
| BMI                                     | kg/m <sup>2</sup>                 | 24.7 ± 4.8    |
| Serum urea at biopsy                    | mmol/L                            | 20.4 ± 12.6   |
| Biopsy result (% of cases)              | Normal histology, %               | 22.2          |
|                                         | ABMR, %                           | 21.4          |
|                                         | TCMR, %                           | 7.7           |
|                                         | Mixed rejection, %                | 8.8           |
|                                         | BK virus nephropathy, %           | 4.4           |
|                                         | Other abnormalities, %            | 35.9          |
|                                         |                                   |               |
| Immunosuppression                       | Tacrolimus, %                     | 66.7          |
|                                         | Cyclosporine, %                   | 25.6          |
|                                         | Mycophenolate, %                  | 93.2          |
|                                         | Methylprednisolone, %             | 92.3          |
|                                         | Azathioprine, %                   | 2.6           |
|                                         | Sirolimus, %                      | 7.7           |
| Serum levels of immunosuppressive agent | Tacrolimus, ng/mL                 | 6.57 ± 3.78   |
|                                         | Cyclosporine, ng/mL (before dose) | 84.74 ± 27.15 |
|                                         | Sirolimus, ng/mL                  | 0.83 ± 0.65   |

BMI—body mass index, ABMR—antibody-mediated rejection, and TCMR—T-cell-mediated rejection. \* eGFR was estimated using the CKD EPI 2021 formula.

The median of each BoF index was calculated in the whole patient cohort, as presented in Table 2. Only a small group of individuals (12–34%) had BoF index values assumed as normal, according to the general population data. More than 50% of the patients had low adaptation, LMI, genital, and adjusted genital ratio indices, while other indices associated with catabolism or activation of the corticotropic axis (Cata-Ana, GT ratio, adrenal gland, and cortisol indices) were high in >50% of patients. In the subgroup of patients with normal kidney transplant histology (no rejection or other abnormalities), these tendencies were even more prominent: a higher percentage of patients had low adaptation, LMI, PMI, genital, and adjusted genital ratio indices, as well as high corticotropic axis index (see Table 3).

**Table 2.** BoF index median values in a cohort of 117 kidney transplant recipients and the percentage of patients with normal, lower-than-normal, or higher-than-normal index values. BoF index formulas are presented in the table.

| Index      | Formula                           | Normal Limits | Median           | % of Patients with a LOW Index Value | % of Patients with a NORMAL Index Value | % of Patients with a HIGH Index Value |
|------------|-----------------------------------|---------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Adaptation | Eos/Mon                           | 0.25–0.50     | 0.11 [0.07–0.21] | 76.9                                 | 12.0                                    | 11.1                                  |
| LMI        | (PLT × Neu × HgB)/(30,000 × WBCs) | 0.85–1.15     | 0.76 [0.60–0.92] | 59.8                                 | 32.5                                    | 7.7                                   |
| PMI        | PLT/(60 × RBCs)                   | 0.85–1.15     | 0.85 [0.66–1.11] | 47.9                                 | 34.2                                    | 17.9                                  |
| Starter    | LMI/PMI                           | 0.85–1.15     | 0.90 [0.67–1.18] | 42.7                                 | 30.8                                    | 26.5                                  |

Table 2. Cont.

| Index                        | Formula                                  | Normal Limits | Median               | % of Patients with a LOW Index Value | % of Patients with a NORMAL Index Value | % of Patients with a HIGH Index Value |
|------------------------------|------------------------------------------|---------------|----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Cata-Ana                     | GT ratio/(Genital ratio × Starter index) | 1.80–3.0      | 4.99 [2.92–8.00]     | 6.8                                  | 23.9                                    | 69.2                                  |
| GT ratio                     | Neu/Lymph                                | 1.50–2.50     | 3.07 [2.19–4.21]     | 10.3                                 | 30.8                                    | 59.0                                  |
| Genital ratio                | RBCs/WBCs                                | 0.80–0.95     | 0.63 [0.45–0.76]     | 76.1                                 | 16.2                                    | 7.7                                   |
| Adjusted Genital ratio       | Genital ratio index × Starter index      | 0.85–1.05     | 0.58 [0.30–0.86]     | 70.1                                 | 17.1                                    | 12.8                                  |
| Adrenal Gland                | GT ratio/(Genital ratio) <sup>2</sup>    | 2.70–3.30     | 7.61 [4.01–16.37]    | 12.0                                 | 12.8                                    | 75.2                                  |
| Cortisol                     | Cata-ana index/Adaptation index          | 3–7           | 37.42 [16.42–111.53] | 2.6                                  | 14.5                                    | 82.9                                  |
| Cortisol/Adrenal Gland Ratio |                                          | 3             |                      | 19.7                                 | 18.8                                    | 61.5                                  |
| TRH reactivation             | Mon/Lymph                                | 0.05–0.25     | 0.44 [0.29–0.59]     | 1.7                                  | 15.4                                    | 82.9                                  |

Eos—eosinophils (in %), Lymph—lymphocytes (in %), Mon—monocytes (in %), Neu—neutrophils (in %), PLT—platelets (in units/mm<sup>3</sup>, i.e., 185,000), RBCs—red blood cells (in thousands/mm<sup>3</sup>, i.e., 4400), and WBCs—white blood cells (in units/mm<sup>3</sup>, i.e., 6100).

Table 3. Patients with normal transplant histology: percentage of patients with low, normal, and high values of each BoF index.

| Index                  | % of Patients with a LOW Index Value | % of Patients with a NORMAL Index Value | % of Patients with a HIGH Index Value |
|------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Adaptation             | 96.2                                 | 0                                       | 3.8                                   |
| LMI                    | 65.4                                 | 30.8                                    | 3.8                                   |
| PMI                    | 50.0                                 | 38.5                                    | 11.5                                  |
| Starter                | 38.5                                 | 26.9                                    | 34.6                                  |
| Cata-Ana               | 11.5                                 | 19.2                                    | 69.2                                  |
| GT ratio               | 15.4                                 | 34.6                                    | 50.0                                  |
| Genital ratio          | 84.6                                 | 7.7                                     | 7.7                                   |
| Adjusted Genital ratio | 73.1                                 | 15.4                                    | 11.5                                  |
| Adrenal Gland          | 11.5                                 | 3.8                                     | 84.6                                  |
| Cortisol               | 3.8                                  | 7.7                                     | 88.5                                  |
| TRH reactivation       | 0                                    | 7.7                                     | 92.3                                  |

3.2. BoF Indices in Patients with and without Transplant Rejection

The patients were divided into two groups according to the histological diagnosis: patients without rejection on histology (non-rejectors:  $n = 70$ ) and patients with transplant rejection (rejectors:  $n = 41$ ). The index values were compared between two groups using the Mann–Whitney test (Table 4). The adaptation index was significantly higher in patients with biopsy-proven transplant rejection, while the ratio of cortisol to the adrenal gland

index was significantly higher in the non-rejector group. The latter group included cases with normal histology and other-than-rejection histology abnormalities (e.g., recurrent glomerulonephritis and global glomerulosclerosis). The same significant results were observed when the indices were compared between the pure normal histology ( $n = 26$ ) and rejection groups.

**Table 4.** Median [IQR] BoF index values in patients with biopsy-proven transplant rejection and patients with no rejection (normal histology or other histological abnormalities such as global glomerulosclerosis or recurrent glomerulonephritis).

| Index                        | Rejectors (Median [IQR]) | Non-Rejectors (Median [IQR]) | <i>p</i> -Value |
|------------------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------|
| Adaptation                   | 0.15 [0.09–0.43]         | 0.10 [0.05–0.18]             | 0.009 **        |
| LMI                          | 0.80 [0.61–0.96]         | 0.71 [0.58–0.90]             | 0.172           |
| PMI                          | 0.79 [0.64–1.09]         | 0.87 [0.66–1.12]             | 0.621           |
| Starter                      | 0.98 [0.70–1.27]         | 0.87 [0.64–1.15]             | 0.236           |
| Cata-Ana                     | 4.5 [2.91–8.29]          | 5.02 [3.01–8.01]             | 0.779           |
| GT ratio                     | 2.98 [2.23–4.06]         | 0.62 [0.44–0.72]             | 0.908           |
| Cortisol                     | 29.54 [10.21–87.94]      | 47.39 [18.50–126.40]         | 0.157           |
| Genital ratio                | 0.67 [0.45–0.80]         | 0.62 [0.44–0.72]             | 0.460           |
| Adrenal gland                | 6.67 [3.27–17.61]        | 8.21 [4.30–16.65]            | 0.467           |
| Adjusted Genital ratio       | 0.69 [0.31–0.97]         | 0.53 [0.30–0.82]             | 0.258           |
| Cortisol/Adrenal gland ratio | 3.77 [1.86–6.66]         | 5.71 [3.41–9.40]             | 0.013 *         |
| TRH reactivation             | 0.41 [0.28–0.56]         | 0.47 [0.30–0.65]             | 0.259           |

\*\**p* < 0.01. \**p* < 0.05.

### 3.3. Cortisol and Adrenal Gland Index Ratio

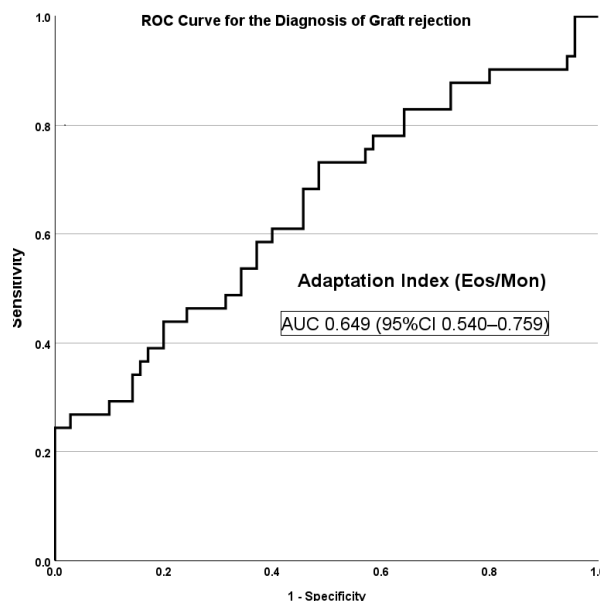
Cortisol should be interpreted together with the adrenal gland index; normally, this ratio should be ~3. In our cohort, only 22 (18.8%) patients had a normal cortisol/adrenal gland index ratio. In this group of normal ratio patients, only 9.1% had normal renal histology, 31.8% had transplant rejection, and 59.1% had other abnormalities on kidney biopsy. Furthermore, 13.6% of patients lost their transplant during the 12 months after graft biopsy, 50% of patients had a functioning graft 1 year after biopsy, and 36.4% of patients had less than 12 months of follow-up.

The patient group with an increased cortisol/adrenal gland index ratio had significantly fewer transplant rejection cases (31.9%) compared to the patients with a low cortisol/adrenal gland index ratio (60.9%;  $p < 0.05$ ); however, the cortisol/adrenal gland index AUC for discriminating patients with transplant rejection was only 0.356 (CI 0.246–0.467). Looking at infectious complications, the group with the higher ratio had a higher average number of cytomegalovirus infection episodes per patient in the last 6 months before biopsy (0.29) compared to the group with the lower ratio (0.09), although this result was not significant ( $p > 0.05$ ).

A total of 91% of patients with a low cortisol/adrenal gland index ratio received methylprednisolone (median dose: 8 mg), while 92% of patients with a high cortisol/adrenal gland index ratio received methylprednisolone (median dose: 6 mg). The median times (months) after transplantation in groups with low, normal, and high ratios were 36.00, 81.00, and 12.00, respectively, but significantly differed only between groups with normal and high ratios ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. Adaptation Index

Our data analysis revealed that more than two-thirds of the kidney transplant recipients had a decreased adaptation index, while patients with biopsy-proven transplant rejection had significantly higher adaptation index values. The ROC analysis of the adaptation index showed an AUC value of 0.649 (95%CI 0.540–0.759) for detecting biopsy-proven kidney transplant rejection (see Figure 1).



**Figure 1.** Adaptation index ROC curve for detecting biopsy-proven kidney transplant rejection. The AUC was 0.649 (95%CI 0.540–0.759).

### 3.5. BoF Index Correlation with Clinical Parameters

Spearman correlation analysis revealed a significant negative correlation between the adaptation index and the tacrolimus level. The LMI and PMI correlated negatively with patient body mass index (BMI). A positive correlation was found between patient BMI and the GT ratio index. There were positive correlations between starter, genital, and adjusted genital ratio indices and graft survival. The serum creatinine concentration at the time of the biopsy correlated positively with the adrenal gland, TRH reactivation, Cata-Ana, and PMI indices and correlated negatively with the genital, adjusted genital ratio, and starter indices. The mycophenolate (MMF) dose correlated negatively with the PMI and positively with the starter index (Table 5). No significant correlations were observed between the considered indices and the steroid dose or cyclosporine concentration. Patients with tacrolimus levels below 5 ng/mL had a significantly higher median value of the adaptation index compared to patients with higher levels of tacrolimus (0.17 [0.11–0.39] vs. 0.10 [0.05–0.15];  $p = 0.002$ ); however, the other indices did not differ significantly between these groups.

**Table 5.** Spearman correlation analysis of BoF indices and patient clinical data.

| Index                           | BMI       | Graft Survival<br>(Months Until<br>Dialysis) | Serum Creatinine<br>Level at the Time<br>of the Biopsy | Tacrolimus Level<br>(ng/mL) | MMF Dose |
|---------------------------------|-----------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------|----------|
| Adaptation                      | −0.062    | 0.196                                        | 0.148                                                  | −0.270 *                    | −0.049   |
| LMI                             | −0.194 *  | 0.265                                        | −0.062                                                 | 0.026                       | 0.624    |
| PMI                             | −0.337 ** | −0.245                                       | 0.218 *                                                | −0.063                      | −0.199 * |
| Starter                         | 0.156     | 0.401 *                                      | −0.241 *                                               | 0.153                       | 0.221 *  |
| Cata-Ana                        | 0.152     | −0.254                                       | 0.323 **                                               | −0.072                      | −0.057   |
| GT ratio                        | 0.204 *   | −0.283                                       | 0.327 **                                               | −0.007                      | −0.013   |
| Genital ratio                   | 0.018     | 0.377 *                                      | −0.218 *                                               | 0.122                       | 0.129    |
| Adjusted Genital<br>ratio       | 0.092     | 0.387 *                                      | −0.235 *                                               | 0.138                       | 0.174    |
| Adrenal Gland                   | 0.108     | −0.276                                       | 0.276 **                                               | −0.082                      | −0.060   |
| Cortisol                        | 0.142     | −0.074                                       | 0.056                                                  | 0.169                       | 0.066    |
| Cortisol/Adrenal<br>Gland Ratio | −0.046    | −0.041                                       | −0.144                                                 | 0.301                       | 0.135    |
| TRH reactivation                | 0.140     | −0.085                                       | 0.250 **                                               | −0.006                      | −0.090   |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level. \* Correlation is significant at the 0.05 level.

### 3.6. BoF Indices and One-Year Graft Survival

The patients were divided into two groups: one group included patients with graft loss during the year after the biopsy ( $n = 18$ ), while the second group included patients without graft loss during the year after the biopsy. It is worth noting that two patients were excluded, who died within 1–2 months after the biopsy due to cryptococcosis or pancreatic abscesses and had an infection at the time of the biopsy.

Non-parametric statistical tests (Mann–Whitney U test) were performed to compare different characteristics between the graft loss group and patients with a working graft (see Table 6). Only serum creatinine levels were significantly higher in the graft loss group; however, there was a tendency toward lower genital ratio, starter, and adjusted genital ratio in the graft loss group, although these differences were not significant (Figure 2).

**Table 6.** Characteristics and BoF indices in patients with and without graft loss during the follow-up 12 months after kidney biopsy.

| Characteristics                                       | Graft Loss<br>(Median [IQR]) | No Graft Loss<br>(Median [IQR]) | <i>p</i> -Value |
|-------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Patient age                                           | 31.50 [28.00–56.50]          | 43.50 [31.2–53.75]              | 0.222           |
| BMI                                                   | 21.92 [20.62–26.00]          | 24.62 [20.82–28.69]             | 0.431           |
| Creatinine at biopsy, $\mu\text{mol/L}$               | 430.00 [294.50–472.50]       | 155.00 [121.00–231.00]          | <0.001 *        |
| Creatinine at 1 month after biopsy, $\mu\text{mol/L}$ | 235.73 [148.00–314.00]       | 216.18 [110.75–247.50]          | 0.042 *         |
| Creatinine 3 months after biopsy, $\mu\text{mol/L}$   | 323.50 [221.25–386.25]       | 128.00 [108.00–175.00]          | 0.043 *         |
| Creatinine 6 months after biopsy, $\mu\text{mol/L}$   | 385.50 [313.5–506.5]         | 153.00 [108.50–218.00]          | 0.023 *         |
| Biopsy time after transplantation                     | 48.50 [11.50–107.5]          | 16.00 [8.00–73.50]              | 0.161           |
| C-reactive protein                                    | 1.03 [0.29–8.25]             | 1.70 [0.90–3.77]                | 0.932           |
| Tacrolimus level, ng/mL                               | 5.00 [3.68–7.68]             | 5.90 [4.00–7.70]                | 0.780           |
| Mycophenolate dose, g                                 | 1.5 [1.0–2.0]                | 2.0 [1.4–2.0]                   | 0.166           |
| Steroid dose, mg                                      | 8.00 [4.00–9.00]             | 4.00 [4.00–8.00]                | 0.119           |

Table 6. Cont.

| Characteristics        | Graft Loss<br>(Median [IQR]) | No Graft Loss<br>(Median [IQR]) | <i>p</i> -Value |
|------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| BoF Indices:           |                              |                                 |                 |
| Adaptation             | 0.11 [0.04–0.28]             | 0.12 [0.07–0.20]                | 0.838           |
| Cata-Ana               | 6.98 [3.08–19.96]            | 4.80 [2.57–6.78]                | 0.735           |
| GT ratio               | 3.94 [2.32–7.56]             | 2.91 [2.08–3.62]                | 0.378           |
| Cortisol               | 58.24 [9.87–155.48]          | 39.25 [14.51–95.47]             | 0.776           |
| Genital ratio          | 0.44 [0.39–0.69]             | 0.64 [0.45–0.80]                | 0.067           |
| Adrenal gland          | 12.44 [4.50–41.89]           | 7.48 [3.17–15.33]               | 0.378           |
| TRH reactivation       | 0.44 [0.19–0.72]             | 0.42 [0.30–0.52]                | 0.838           |
| LMI                    | 0.59 [0.50–0.88]             | 0.80 [0.62–0.97]                | 0.197           |
| PMI                    | 0.90 [0.76–1.11]             | 0.75 [0.63–1.04]                | 0.154           |
| Starter                | 0.73 [0.49–1.03]             | 1.03 [0.76–1.27]                | 0.067           |
| Adjusted genital ratio | 0.31 [0.16–0.72]             | 0.69 [0.35–0.96]                | 0.067           |

\* Significance at the 0.05 level.

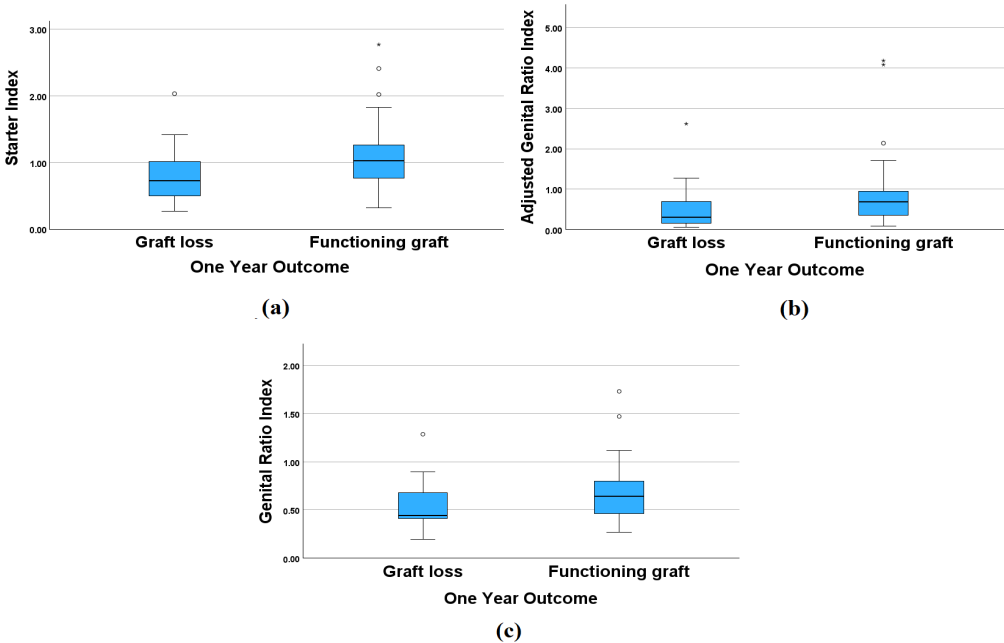


Figure 2. Starter (a), adjusted genital (b), and genital ratio (c) indices in patients with and without graft loss during follow-up 12 months after kidney biopsy. Mild outliers are marked with a circle (°), and extreme outliers are marked with an asterisk (\*).

#### 4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first publication focused on endobiogenic indices in a kidney transplant recipient cohort. Although endobiogenic medicine uses many more indices and includes a holistic approach to the patient, including inspection, thorough anamnesis of the patient, and evaluation of the whole combination of indices (instead of drawing conclusions from one abnormal index), our aim was to reflect the tendencies of such indices in kidney transplant recipients receiving maintenance immunosuppressive therapy [21]. All indices in this paper were calculated from the complete blood count test, with differentials taken 0–7 days before kidney allograft biopsy, which was performed for various clinical indications.

The cortisol and adrenal gland indices represent the activity of the corticotropic axis. The cortisol index normally expresses the role of cortisol during adaptation; however, patients after kidney transplantation who regularly take steroids for immunosuppression are likely to have an increased cortisol index and an increased cortisol/adrenal gland ratio. In our cohort, 91% of patients with a low cortisol index were taking steroids, while more than 60% of patients with a low index ratio had biopsy-proven transplant rejection at the time of measurement. This finding suggests that some recipients with low values of this ratio index may show a state of under-immunosuppression. In contrast, there was a tendency toward higher numbers of CMV infections and a lower rate of transplant rejection in patients with a high cortisol/adrenal gland ratio, indicating a state of over-immunosuppression, despite receiving a lower dose of steroids compared to the group with a low cortisol/adrenal gland index ratio. Therefore, this index ratio might be helpful in identifying individual patients presenting over- or under-immunosuppression for the guidance of immunosuppressive agent dosing; however, more data are needed for validation.

Our data analysis showed that more than two-thirds of kidney transplant recipients had a lower-than-normal adaptation index, which is not surprising as this index is calculated as the ratio of eosinophils to monocytes and, in transplanted patients, oral immunosuppressive therapy with corticosteroids may lower eosinophil levels [40]. Our results revealed that patients experiencing allograft rejection had significantly higher adaptation index values, indicating lower glucocorticoid activity. Moreover, there are published data indicating that eosinophilia often precedes T-cell-mediated transplant rejection, as well as the successful use of corticosteroids for managing this type of rejection through the suppression of eosinophils [41,42].

More than half of the patients had decreased adaptation, LMI, genital, and adjusted genital ratio indices. According to the theory of endobiogeny, these data indicate that kidney transplant recipients tend to have low ACTH activity due to the inhibition caused by high cortisol activity associated with steroid use. A low LMI suggests a dysfunctional response to aggression and a tendency to solicit white blood cells from the perihepatic circulation more than from the splanchnic circulation. It is calculated as the ratio of platelets, neutrophils, and hemoglobin to white blood cells, and in our cohort of kidney transplant recipient patients, this ratio was decreased in more than half of the patients. Moreover, the indices associated with catabolism and activation of the corticotropic axis were increased, indicating an effect of steroid catabolic activity.

Higher tacrolimus levels were associated with lower patient adaptation. This can be explained by the ability of tacrolimus to reduce eosinophil levels by promoting eosinophil apoptosis [43]; however, tacrolimus does not strongly affect monocyte function to a clinically relevant degree and only changes macrophage polarization [44].

Patients with a higher BMI had lower PMI and LMI values, which can be explained by the higher platelet count in patients with an increased BMI, as mentioned in several papers [45–47], and a positive significant correlation between BMI and platelet count was observed in our data. Notably, platelets are present in the denominator of both index formulas. Higher BMI was associated with a higher GT index, which is the ratio of neutrophils to lymphocytes, and data on neutrophilia and lymphocytopenia in obese patients have been previously reported [48–50]. According to the theory of endobiogeny,

an elevated GT ratio indicates efficient thyroid activity and the likelihood of the thyrotropic axis to solicit inflammation to aid in catabolism [31].

A tendency of longer graft survival was observed in patients with higher starter, genital, and adjusted genital ratios. The genital ratio increases with higher red blood cells and reflects the dominant activity of androgens over estrogens, according to the theory of endobiogeny. However, longer graft survival is closely associated with better functioning of the graft, and on the other hand, anemia is a sign of kidney failure [51]. Therefore, higher red blood cells and a higher genital ratio are linked to better functioning of the graft and, thus, longer graft survival.

The negative correlation between the MMF dose and PMI can be explained by the effect of MMF on bone marrow function; in particular, it suppresses the production of red blood cells more than platelets [52,53]. The PMI is in the denominator of the starter index formula; so, the latter index is positively correlated with the MMF dose. In endobiogenic medicine, an increased starter index is interpreted as increased glucose mobilization from liver glucagon in response to stress and the need for adaptation [22].

One of the limitations is that the study patients formed a very heterogenic group of kidney transplant recipients with a very different duration of overall immunosuppression, with the time after transplantation ranging from 0 to 28 years. In other words, the patients may not have been matched regarding variables that can affect clinical outcomes, including graft loss and duration of graft survival. Moreover, the allograft histology was very heterogenous, including normal histology as well as transplant rejection (both antibody-mediated and T-cell-mediated), recurrent glomerulopathy, polyoma virus infection, global glomerulosclerosis, and so on. It would be rational to analyze BoF indices in larger groups of patients with each histological diagnosis. Moreover, we did not have data about patient comorbidities such as diabetes, thyroid diseases, and medications used for their therapy, which could affect the BoF index results.

Despite these limitations, we provide the first overview of endobiogenic indices in a very specific patient population and connect the interpretation of these indices from traditional and endobiogenic medicine points of view. By increasingly applying an individualized approach to patients in clinical practice, the principles of endobiogenic medicine could complement traditional medicine, especially when making decisions about the patient's treatment, while assessing the risk of complications. BoF indices provide additional knowledge about the patient's endocrine system activity, metabolism, and other ongoing processes; however, so far, these indices have been studied and applied mainly in the general population. Chronic kidney disease and chronic immunosuppression significantly alter physiological processes; so, the interpretation of BoF indices applied to the general population may not be appropriate for patients after kidney transplantation. As such, more scientific evidence is needed to apply the principles of endobiogenic medicine to this patient population. This article provides data about BoF values in patients with normal graft histology, as well as the correlation between indices and graft rejection and over-immunosuppressive conditions.

## 5. Conclusions

Most of the kidney transplant recipients had abnormal BoF index values, reflecting increased corticotropic effects on their cells. This was even more prominent in the subgroup of patients with normal transplant histology. Therefore, BoF indices should be interpreted with caution in kidney transplant recipient populations due to the corticotropic effects of maintenance immunosuppressive therapy. Among all the calculated indices, only the adaptation index discriminated patients with biopsy-proven transplant rejection from those without it. As such, this index may be used in addition to other biomarkers when kidney transplant rejection is suspected.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.M. and D.S.; methodology, E.M.; software, E.M.; formal analysis, E.M.; investigation, E.M.; resources, E.M.; data curation, E.M.; writing—original draft preparation, E.M.; writing—review and editing, D.S. and M.M.; visualization, E.M.; and supervision, M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** This study was approved by the Bioethics Committee of the Vilnius Region (approval No. 158200-17-901-409, 7 February 2017).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all the subjects involved in this study.

**Data Availability Statement:** The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the author upon request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Chaudhry, D.; Chaudhry, A.; Peracha, J.; Sharif, A. Survival for Waitlisted Kidney Failure Patients Receiving Transplantation versus Remaining on Waiting List: Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ* **2022**, *376*, e068769. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Augustine, J. Kidney Transplant: New Opportunities and Challenges. *Cleve. Clin. J. Med.* **2018**, *85*, 138–144. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vamenta-Morris, H.; Keith, D.S. Chronic Maintenance Immunosuppression in Renal Transplantation: The Unrealized Goal of Improved Long-Term Outcomes. *Minerva Urol. Nefrol.* **2015**, *67*, 117–138. [\[PubMed\]](#)
- Van Den Born, J.C.; Meziyerh, S.; Vart, P.; Bakker, S.J.L.; Berger, S.P.; Florquin, S.; De Fijter, J.W.; Gomes-Neto, A.W.; Idu, M.M.; Pol, R.A.; et al. Comparison of 2 Immunosuppression Minimization Strategies in Kidney Transplantation: The ALLEGRO Trial. *Transplantation* **2024**, *108*, 556–566. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Van Sandwijk, M.S.; De Vries, A.P.J.; Bakker, S.J.L.; Ten Berge, I.J.M.; Berger, S.P.; Bouatou, Y.R.; De Fijter, J.W.; Florquin, S.; Homan Van Der Heide, J.J.; Idu, M.M.; et al. Early Steroid Withdrawal Compared With Standard Immunosuppression in Kidney Transplantation—Interim Analysis of the Amsterdam-Leiden-Groningen Randomized Controlled Trial. *Transplant. Direct* **2018**, *4*, e354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cheung, C.Y.; Tang, S.C.W. An Update on Cancer after Kidney Transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2019**, *34*, 914–920. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Borriello, M.; Ingrosso, D.; Perna, A.F.; Lombardi, A.; Maggi, P.; Altucci, L.; Caraglia, M. BK Virus Infection and BK-Virus-Associated Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *Genes* **2022**, *13*, 1290. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rostaing, L.; Wéclawiak, H.; Mengelle, C.; Kamar, N. Viral Infections after Kidney Transplantation. *Minerva Urol. Nefrol.* **2011**, *63*, 59–71. [\[PubMed\]](#)
- Agrawal, A.; Ison, M.G.; Danziger-Isakov, L. Long-Term Infectious Complications of Kidney Transplantation. *CJASN* **2022**, *17*, 286–295. [\[CrossRef\]](#)
- Azadi, S.; Azarpira, N.; Roozbeh, J.; Ezzatzadegan-Jahromi, S.; Raees-Jalali, G.A.; Foroughinia, F.; Karimzadeh, I. Genetic Polymorphisms of Glucocorticoid Receptor and Their Association with New-Onset Diabetes Mellitus in Kidney Transplant Recipients. *Gene* **2023**, *856*, 147138. [\[CrossRef\]](#)
- Faddoul, G.; Nadkarni, G.N.; Bridges, N.D.; Goebel, J.; Hricik, D.E.; Formica, R.; Menon, M.C.; Morrison, Y.; Murphy, B.; Newell, K.; et al. Analysis of Biomarkers Within the Initial 2 Years Posttransplant and 5-Year Kidney Transplant Outcomes: Results From Clinical Trials in Organ Transplantation-17. *Transplantation* **2018**, *102*, 673–680. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Loupy, A.; Haas, M.; Roufosse, C.; Naesens, M.; Adam, B.; Afrouzian, M.; Akalin, E.; Alachkar, N.; Bagnasco, S.; Becker, J.U.; et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and Clarification of Criteria for T Cell- and Antibody-Mediated Rejection. *Am. J. Transpl.* **2020**, *20*, 2318–2331. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Haas, M.; Loupy, A.; Lefaucheur, C.; Roufosse, C.; Glotz, D.; Seron, D.; Nankivell, B.J.; Halloran, P.F.; Colvin, R.B.; Akalin, E.; et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised Diagnostic Criteria for Chronic Active T Cell-Mediated Rejection, Antibody-Mediated Rejection, and Prospects for Integrative Endpoints for next-Generation Clinical Trials. *Am. J. Transpl.* **2018**, *18*, 293–307. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mayer, K.A.; Omic, H.; Weseslindtner, L.; Doberer, K.; Reindl-Schwaighofer, R.; Viard, T.; Tillgren, A.; Haindl, S.; Casas, S.; Eskandary, F.; et al. Levels of Donor-Derived Cell-Free DNA and Chemokines in BK Polyomavirus-Associated Nephropathy. *Clin. Transpl.* **2022**, *36*, e14785. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Arnau, A.; Benito-Hernández, A.; Ramos-Barrón, M.A.; García-Unzueta, M.T.; Gómez-Román, J.J.; Gómez-Ortega, J.M.; López-Hoyos, M.; San Segundo, D.; Ruiz, J.C.; Rodrigo, E. Urinary C-X-C Motif Chemokine 10 Is Related to Acute Graft Lesions Secondary to T Cell- and Antibody-Mediated Damage. *Ann. Transpl.* **2021**, *26*, e929491. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Fahmy, N.M.; Yamani, M.H.; Starling, R.C.; Ratliff, N.B.; Young, J.B.; McCarthy, P.M.; Feng, J.; Novick, A.C.; Fairchild, R.L. Chemokine and Chemokine Receptor Gene Expression Indicates Acute Rejection of Human Cardiac Transplants. *Transplantation* **2003**, *75*, 72–78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

17. Hirt-Minkowski, P.; Handschin, J.; Stampf, S.; Hopfer, H.; Menter, T.; Senn, L.; Hönger, G.; Wehmeier, C.; Amico, P.; Steiger, J.; et al. Randomized Trial to Assess the Clinical Utility of Renal Allograft Monitoring by Urine CXCL10 Chemokine. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2023**, *34*, 1456–1469. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Zhang, R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *CJASN* **2018**, *13*, 182–192. [\[CrossRef\]](#)
19. Cheung, C.Y.; Tang, S.C.W. Personalized Immunosuppression after Kidney Transplantation. *Nephrology* **2022**, *27*, 475–483. [\[CrossRef\]](#)
20. Doberer, K.; Schiemann, M.; Strassl, R.; Hauptenthal, F.; Dermuth, F.; Görzer, I.; Eskandary, F.; Reindl-Schwaighofer, R.; Kikić, Ž.; Puchhammer-Stöckl, E.; et al. Torque Teno Virus for Risk Stratification of Graft Rejection and Infection in Kidney Transplant Recipients—A Prospective Observational Trial. *Am. J. Transpl.* **2020**, *20*, 2081–2090. [\[CrossRef\]](#)
21. Lapraz, J.-C.; Hedayat, K.M. Endobiogeny: A Global Approach to Systems Biology (Part 1 of 2). *Glob. Adv. Health Med.* **2013**, *2*, 64–78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Lapraz, J.-C.; Hedayat, K.M.; Pauly, P. Endobiogeny: A Global Approach to Systems Biology (Part 2 of 2). *Glob. Adv. Health Med.* **2013**, *2*, 32–44. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Hedayat, K.M. The Theory of Endobiogeny: Biological Modeling Using Downstream Physiologic Output as Inference of Upstream Global System Regulation. *J. Complex. Health Sci.* **2020**, *3*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
24. Haller, M.C.; Kainz, A.; Baer, H.; Oberbauer, R. Dialysis Vintage and Outcomes after Kidney Transplantation: A Retrospective Cohort Study. *CJASN* **2017**, *12*, 122–130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Stangou, M.J.; Fylaktou, A.; Ivanova-Shivarova, M.I.; Theodorou, I. Editorial: Immunosenescence and Immunoexhaustion in Chronic Kidney Disease and Renal Transplantation. *Front. Med.* **2022**, *9*, 874581. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Salminen, A. Immunosuppressive Network Promotes Immunosenescence Associated with Aging and Chronic Inflammatory Conditions. *J. Mol. Med.* **2021**, *99*, 1553–1569. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Stavropoulou, E.; Kantartzis, K.; Tsigalou, C.; Aftzoglou, K.; Voidarou, C.; Konstantinidis, T.; Chifiriuc, M.C.; Thodis, E.; Bezirtzoglou, E. Microbiome, Immunosenescence, and Chronic Kidney Disease. *Front. Med.* **2021**, *8*, 661203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Hedayat, K.M.; Challvet, D.; Yang, M.; Golshan, S.; Allix-Beguec, C.; Beneteaud, S.; Schmit, T. Evolution of Modeled Cortisol Is Prognostic of Death in Hospitalized Patients With COVID-19 Syndrome. *Front. Med.* **2022**, *9*, 912678. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Braukyliene, R.; Hedayat, K.; Zajanckauskiene, L.; Jurenas, M.; Unikis, R.; Aldujeli, A.; Petrokas, O.; Zabiela, V.; Steponaviciute, R.; Vitkauskienė, A.; et al. Prognostic Value of Cortisol Index of Endobiogeny in Acute Myocardial Infarction Patients. *Medicina* **2021**, *57*, 602. [\[CrossRef\]](#)
30. Hedayat, K.; Shuff, B.M.; Lapraz, J.-C.; Barsotti, T.; Golshan, S.; Hong, S.; Greenberg, B.; Mills, P.J. Genito-Thyroid Index: A Global Systems Approach to the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio According to the Theory of Endobiogeny Applied to Ambulatory Patients with Chronic Heart Failure. *J. Cardiol. Clin. Res.* **2017**, *5*, 1091.
31. Hedayat, K.M.; Lapraz, J.-C. A New Approach to Biological Modeling: Introduction to the Biology of Functions. In *The Theory of Endobiogeny*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 215–254. ISBN 978-0-12-816903-2.
32. Beishuizen, A.; Vermes, I. Relative Eosinophilia (Thorn Test) as a Bioassay to Judge the Clinical Relevance of Cortisol Values during Severe Stress. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 3400–3401. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Pelekanou, V.; Kampa, M.; Kiagiadaki, F.; Deli, A.; Theodoropoulos, P.; Agrogiannis, G.; Patsouris, E.; Tsapis, A.; Castanas, E.; Notas, G. Estrogen Anti-Inflammatory Activity on Human Monocytes Is Mediated through Cross-Talk between Estrogen Receptor ERα36 and GPR30/GPER1. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *99*, 333–347. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Okamoto, M.; Suzuki, T.; Mizukami, Y.; Ikeda, T. The Membrane-type Estrogen Receptor G-protein-coupled Estrogen Receptor Suppresses Lipopolysaccharide-induced Interleukin 6 via Inhibition of Nuclear Factor-kappa B Pathway in Murine Macrophage Cells. *Anim. Sci. J.* **2017**, *88*, 1870–1879. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Garrod, O. The Pharmacology of Cortisone, Cortisol (Hydrocortisone) and Their New Analogues. *Postgrad. Med. J.* **1958**, *34*, 300–309. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Rinehart, J.J.; Balcerzak, S.P.; Sagone, A.L.; LoBuglio, A.F. Effects of Corticosteroids on Human Monocyte Function. *J. Clin. Investig.* **1974**, *54*, 1337–1343. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Sabag, N.; Castrillon, M.A.; Tchermitchin, A. Cortisol-Induced Migration of Eosinophil Leukocytes to Lymphoid Organs. *Experientia* **1978**, *34*, 666–667. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Thorn, G.W. A Test for Adrenal Cortical Insufficiency: The Response to Pituitary Adrenocorticotrophic Hormone. *JAMA* **1948**, *137*, 1005. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Hedayat, K.M.; Lapraz, J.-C. *The Theory of Endobiogeny. Volume 1, Global Systems Thinking and Biological Modeling for Clinical Medicine*, 1st ed.; Academic Press: London, UK, 2019; ISBN 978-0-12-817326-8.
40. Ortega, H.; Llanos, J.-P.; Lafeuille, M.-H.; Duh, M.S.; Germain, G.; Lejeune, D.; Sama, S.; Bell, C.; Hahn, B. Effects of Systemic Corticosteroids on Blood Eosinophil Counts in Asthma: Real-World Data. *J. Asthma* **2019**, *56*, 808–815. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Lautenschlager, I.; Willebrand, E.V.; Häyry, P. Blood eosinophilia, steroids, and rejection. *Transplantation* **1985**, *40*, 354–356. [\[CrossRef\]](#)
42. Almirall, J.; Campistol, J.M.; Sole, M.; Andreu, J.; Revert, L. Blood and Graft Eosinophilia as a Rejection Index in Kidney Transplant. *Nephron* **1993**, *65*, 304–309. [\[CrossRef\]](#)
43. Kandikattu, H.K.; Venkateshaiah, S.U.; Verma, A.K.; Mishra, A. Tacrolimus (FK506) Treatment Protects Allergen-, IL-5- and IL-13-induced Mucosal Eosinophilia. *Immunology* **2021**, *163*, 220–235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

44. Kannegieter, N.M.; Hesselink, D.A.; Dieterich, M.; Kraaijeveld, R.; Rowshani, A.T.; Leenen, P.J.M.; Baan, C.C. The Effect of Tacrolimus and Mycophenolic Acid on CD14+ Monocyte Activation and Function. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170806. [[CrossRef](#)]
45. Purdy, J.C.; Shatzel, J.J. The Hematologic Consequences of Obesity. *Eur. J. Haematol.* **2021**, *106*, 306–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Samocha-Bonet, D.; Justo, D.; Rogowski, O.; Saar, N.; Abu-Abeid, S.; Shenkerman, G.; Shapira, I.; Berliner, S.; Tomer, A. Platelet Counts and Platelet Activation Markers in Obese Subjects. *Mediat. Inflamm.* **2008**, *2008*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Konstantinides, S.; Schäfer, K.; Koschnick, S.; Loskutoff, D.J. Leptin-Dependent Platelet Aggregation and Arterial Thrombosis Suggests a Mechanism for Atherothrombotic Disease in Obesity. *J. Clin. Investig.* **2001**, *108*, 1533–1540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Aydın, M. Neutrophil Lymphocyte Ratio in Obese Adolescents. *North. Clin. Istanbul.* **2015**, *2*, 87. [[CrossRef](#)]
49. Fang, Q.; Tong, Y.-W.; Wang, G.; Zhang, N.; Chen, W.-G.; Li, Y.-F.; Shen, K.-W.; Wu, B.-W.; Chen, X.-S. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Obesity, and Breast Cancer Risk in Chinese Population. *Medicine* **2018**, *97*, e11692. [[CrossRef](#)]
50. Kain, V.; Van Der Pol, W.; Mariappan, N.; Ahmad, A.; Eipers, P.; Gibson, D.L.; Gladine, C.; Vigor, C.; Durand, T.; Morrow, C.; et al. Obesogenic Diet in Aging Mice Disrupts Gut Microbe Composition and Alters Neutrophil:Lymphocyte Ratio, Leading to Inflamed Milieu in Acute Heart Failure. *FASEB J.* **2019**, *33*, 6456–6469. [[CrossRef](#)]
51. Iwamoto, H.; Nakamura, Y.; Konno, O.; Hama, K.; Yokoyama, T.; Kihara, Y.; Kawachi, S.; Shimazu, M. Correlation Between Post Kidney Transplant Anemia and Kidney Graft Function. *Transplant. Proc.* **2014**, *46*, 496–498. [[CrossRef](#)]
52. Van Besouw, N.M.; Van Der Mast, B.J.; Smak Gregoor, P.J.H.; Hesse, C.J.; IJzermans, J.N.M.; Van Gelder, T.; Weimar, W. Effect of Mycophenolate Mofetil on Erythropoiesis in Stable Renal Transplant Patients Is Correlated with Mycophenolic Acid Trough Levels. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1999**, *14*, 2710–2713. [[CrossRef](#)]
53. Pile, T.; Kieswich, J.; Harwood, S.; Yaqoob, M.M. A Possible Explanation for Anemia in Patients Treated With Mycophenolic Acid. *Transplantation* **2011**, *92*, 1316–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

# UŽRAŠAMS

# UŽRAŠAMS

# UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
[bookshop.vu.lt](http://bookshop.vu.lt), [journals.vu.lt](http://journals.vu.lt)  
Tiražas 25 egz.