



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Klinika Nefrologii Pediatricznej
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

**Nowe markery ostrego uszkodzenia nerek
u dzieci poddanych allogenicznemu przeszczepieniu
hematopoetycznych komórek macierzystych**

Rozprawa doktorska

lek. Monika Augustynowicz

Promotorzy:

Prof. dr hab. n. med. Kinga Musiał

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Kałwak

Wrocław 2022

*Składam serdeczne podziękowania **Pani Profesor Kindze Musiał** za opiekę promotorską, cenne uwagi merytoryczne, zaangażowanie, okazaną cierpliwość i wszelką pomoc udzieloną przy realizacji tej pracy.*

*Dziękuję również **Panu Profesorowi Krzysztofowi Kałwakowi** za wsparcie merytoryczne i wszelkie uwagi niezbędne w przeprowadzeniu badań i przygotowaniu pracy.*

*Pragnę podziękować także **Pani Profesor Danucie Zwolińskiej** za umożliwienie mi realizacji przewodu doktorskiego w Klinice Nefrologii Pediatricznej, wsparcie oraz motywowanie do pracy.*

Wyrażam również wdzięczność wobec wszystkich osób z Kliniki Nefrologii Pediatricznej oraz Kliniki Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu zaangażowanych przy rekrutowaniu pacjentów, realizacji badań oraz interpretacji uzyskanych wyników.

Za wszelką udzieloną pomoc i wsparcie serdecznie dziękuję.

*Niniejszą pracę dedykuję mojej Rodzinie,
w tym szczególnie Mężowi i Dzieciom*

Spis treści:

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską.....	4
2. Wykaz skrótów.....	5
3. Wprowadzenie.....	7
4. Założenia i cele pracy.....	13
5. Materiał i metody.....	14
6. Omówienie prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	17
7. Podsumowanie wyników.....	20
8. Dyskusja.....	21
9. Wnioski.....	27
10. Piśmiennictwo.....	28
11. Streszczenie.....	35
12. Summary.....	38
13. Załączniki	
13.1. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.....	41
13.2. Oświadczenia współautorów.....	66

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

	IF	Punkty MNiSW
1. MONIKA AUGUSTYNOWICZ, AGNIESZKA BARGENDA-LANGE, KRZYSZTOF KAŁWAK, DANUTA ZWOLIŃSKA, KINGA MUSIAŁ. Markers of acute kidney injury in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Adv.Clin.Exp.Med. 2019 Vol.28 no.8 s.1111-1118	1,514	70,00
2. MONIKA AUGUSTYNOWICZ, KRZYSZTOF KAŁWAK, DANUTA ZWOLIŃSKA, KINGA MUSIAŁ. The incidence of acute kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. Adv.Clin.Exp.Med. 2021 Vol.30 no.1 s.87-92	1,727	70,00
3. KINGA MUSIAŁ, MONIKA AUGUSTYNOWICZ, IZABELLA MIŚKIEWICZ-MIGOŃ, KRZYSZTOF KAŁWAK, MAREK USSOWICZ, DANUTA ZWOLIŃSKA. Clusterin as a new marker of kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - a pilot study. J.Clin.Med. 2020 Vol.9 no.8 art.2599, DOI: 10.3390/jcm9082599.	4,241	140,00
Sumaryczna punktacja:	7,482	280,00

2. Wykaz skrótów:

- **AKI** - acute kidney injury - ostre uszkodzenie nerek
- **pRIFLE** - pediatric Risk Injury Failure Loss End-stage kidney disease classification - pediatryczna skala ostrego uszkodzenia nerek RIFLE
- **KDIGO** - Kidney Disease Improving Global Outcomes
- **RAAS** - Renin Angiotensin Aldosterone System - układ renina angiotensyna aldosteron
- **GvHD** - Graft versus Host Disease - choroba przeszczep przeciw gospodarzowi
- **eGFR** - estimated glomerular filtration rate - szacowana wartość przesączania kłębuszkowego
- **HSCT** - hematopoietic stem cell transplantation - przeszczepienie komórek hematopoetycznych
- **alloHSCT** - allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - allogeniczne przeszczepienie komórek hematopoetycznych
- **autoHSCT** - autologous hematopoietic stem cells transplantation - autologiczne przeszczepienie komórek hematopoetycznych
- **TBI** - total body irradiation - napromieniowanie całego ciała
- **BKV** – polyoma BK virus - wirus polioma BK
- **ADV** - adenovirus - adenowirus
- **DMSO** - dimethylsulphoxide - dimetylosulfotlenek
- **VOD** - venoocclusive disease - choroba wenookluzyjna wątroby
- **HSOS** - hepatic sinusoidal obstructive syndrome - zespół niedrożności zatokowej wątroby
- **TA-TMA** - transplant-associated thrombotic microangiopathy - zakrzepowa mikroangiopatia związana z transplantacją
- **CMV** - cytomegalovirus - cytomegalowirus
- **ATN** - acute tubular necrosis - ostra martwica cewek nerkowych
- **KIM-1** - kidney injury molecule 1 - cząsteczka uszkodzenia nerek 1
- **NGAL** - neutrophil gelatinase-associated lipocalin - lipokalina neutrofilów związana z żelatynazą
- **NAG** - N-acetyl-beta-D-glucosaminidase - N-acetylo-beta-D-glukozaminidaza
- **MCP-1** - monocyte chemoattractant protein 1 - białko chemotaktyczne monocytów 1

- **L-FABP** - liver-type fatty acid-binding protein - wątrobowe białko wiążące kwasy tłuszczowe
- **IL-18** - interleukin-18 - interleukina-18
- **IGFBP-7** - insulin-like growth factor-binding protein 7 - insulinopodobne białko wiążące czynnik wzrostu 7
- **ELISA** - enzyme-linked immunosorbent assay - test immunoenzymatyczny
- **sCr** – serum creatinine - stężenie kreatyniny w surowicy

3. Wprowadzenie

Ostre uszkodzenie nerek (AKI – acute kidney injury) to nagła utrata ich funkcji objawiająca się zwiększeniem stężenia kreatyniny w surowicy, obniżeniem przesączania kłębuszkowego, nagromadzeniem mocznika i innych produktów przemiany azotowej oraz spadkiem diurezy i zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej organizmu.

3.1. Klasyfikacje AKI

Spośród licznych klasyfikacji AKI dwie zostały zwalidowane w populacji pediatrycznej.

pRIFLE jest pediatryczną modyfikacją 5-stopniowej skali RIFLE definiującej stadia ostrego uszkodzenia nerek u dorosłych, opartą na wielkości ubytku filtracji kłębuszkowej oraz ilości moczu oddanego w przedziale czasowym [1,2]. Wartość przesączania kłębuszkowego wyliczana jest ze wzoru Schwartz [3].

Poszczególne stadia zostały sklasyfikowane w następujący sposób:

R (risk) ryzyko wystąpienia uszkodzenia nerek

↓ eGFR o 25%, diureza < 0,5 ml/kg/godz. przez 8 godzin

I (injury) uszkodzenie nerek

↓ eGFR o 50%, diureza < 0,5 ml/kg/godz. przez 16 godzin

F (failure) niewydolność nerek

↓ eGFR o 75% lub < 35 ml/min/1,73m²,

diureza < 0,3 ml/kg/godz. przez 24 godziny lub anuria przez 12 godzin

L (loss) utrata funkcji nerek

uszkodzenie nerek trwające powyżej 4 tygodni,

wymagające leczenia nerkozastępczego

E (end-stage renal disease) schyłkowa niewydolność nerek

leczenie nerkozastępcze > 3 miesięcy

KDIGO uwzględnia 3 kategorie AKI w zależności od stopnia nasilenia zmian [4,5]:

- 1 stopień - ↑ sCr 1,5-1,9 razy w stosunku do wartości wyjściowych/↑ sCr o 0,3 mg/dl lub diureza <0,5 ml/godz przez 6-12 godzin
- 2 stopień - ↑ sCr 2-2,9 razy w stosunku do wartości wyjściowych lub diureza <0,5 ml/godz przez >12 godzin
- 3 stopień - ↑ sCr > 3 razy w stosunku do wartości wyjściowych/ sCr >4 mg/dl

lub eGFR<35 ml/min/1,73m²
lub rozpoczęcie leczenia nerkozastępczego
lub diureza <0,3 ml/godz oddawanego moczu przez 24 godziny
lub anuria trwająca co najmniej 12 godzin

3.2. AKI w populacji pediatrycznej

Na podstawie danych literaturowych średnia częstość AKI wśród pacjentów pediatrycznych jest szacowana na 0,7/1000 (0,07%) w populacji ogólnej [6]. Wartości te różnią się w zależności od regionu, zastosowanych kryteriów rozpoznania lub metody badania, często uniemożliwiającej ocenę wyjściowego stężenia kreatyniny w surowicy. AKI występowało u 0,99% dzieci hospitalizowanych w Tajlandii [7], ale według danych walijskich, amerykańskich, angielskich czy chińskich wartości te sięgały nawet 20% [8,9,10,11]. Sutherland i wsp. oszacowali częstość AKI u hospitalizowanych dzieci na 37-51%, w zależności od zastosowanych kryteriów rozpoznania (AKIN, KDIGO, pRIFLE), a stopień zgodności rozpoznań pomiędzy zastosowanymi klasyfikacjami wynosił 84,5-91,7% [12]. Wśród dzieci leczonych w oddziałach intensywnej opieki medycznej odsetek rozpoznania AKI był już znacznie wyższy i wynosił w większości publikacji ponad połowę [13,14].

3.3. AKI w przebiegu transplantacji komórek hematopoetycznych

Transplantacja komórek hematopoetycznych jest stale rozwijającą się dziedziną medycyny. Zabieg ten znajduje coraz szersze zastosowanie, zarówno u osób dorosłych, jak i u dzieci. Głównym wskazaniem do jego przeprowadzenia są nowotwory, w większości układu krwiotwórczego, ale także inne schorzenia hematologiczne, wrodzone niedobory odporności czy choroby metaboliczne. Zabieg ten nie jest pozbawiony powikłań. Wśród nich opisywane są zarówno ostre uszkodzenie nerek, jak i przewlekła choroba nerek. Największe ryzyko rozwoju AKI towarzyszy mieloablacyjnej allotransplantacji komórek hematopoetycznych (50-91%), w niemieloablacyjnym alloHSCT i w przebiegu autotransplantacji jest niższe (odpowiednio 29-54% i 12-52%)[15].

Patofizjologia ostrego uszkodzenia nerek w przebiegu transplantacji komórek hematopoetycznych jest bardzo złożona, a nefrotoksyczność leków wydaje się być znaczącym czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju AKI. Działanie takie wykazują zarówno leki stosowane w kondycjonowaniu (busulfan, treosulfan, tiotepa, fludarabina, karboplatyna,

cisplatyna, etopozyd, melfalan, cyklofosfamid, ifosfamid), w profilaktyce choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (cyklosporyna A, takrolimus, metotreksat), jak i w zapobieganiu lub leczeniu infekcji. Ich wpływ na funkcję nerek obejmuje ostrą martwicę cewek nerkowych w mechanizmie przednerkowym, bezpośrednie działanie toksyczne lub odkładanie się kryształów leku powodujące zanerkową AKI. Dodatkowo efekt może potęgować zależność toksyczności od dawki [16].

DMSO stosowany w krioprotekcji mrożonych preparatów komórek macierzystych może być czynnikiem sprzyjającym rozwojowi AKI w przypadku przeszczepów autologicznych [17]. Do innych ważnych przyczyn uszkodzenia nefronu w przebiegu procedury transplantacyjnej należy nefropatia popromienna wywołana TBI, ujawniająca się zazwyczaj po kilku miesiącach od zabiegu. W patofizjologii AKI u pacjentów po przeszczepieniu komórek macierzystych istotną rolę odgrywa także choroba przeszczep przeciw gospodarzowi, która występuje często, choćby w niewielkim nasileniu, mimo stosowanej profilaktyki [18]. Kolejnym istotnym powikłaniem jest VOD, znane także jako HSOS, w którym dochodzi do włóknienia endotelium zatok wątroby, nadciśnienia wrotnego, hipotensji systemowej i AKI wskutek nadmiernej aktywacji układu RAA [19]. TA-TMA to z kolei zespół uszkodzeń endotelium o złożonej etiopatogenezie, skutkujący powstawaniem mikrozakrzepów w drobnych naczyniach [20]. Ważną rolę odgrywają także infekcje, zwłaszcza zakażenie CMV, ADV, BKV, EBV oraz uogólnione reakcje zapalne o etiologii zarówno bakteryjnej, wirusowej, jak i grzybiczej [21]. U większości pacjentów występuje mnogość powikłań, a ich nefrotoksyczny potencjał wzajemnie się sumuje. Powyższe zagadnienia zostały omówione w pracy poglądowej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej (praca 1) .

W nielicznych doniesieniach dotyczących populacji pediatrycznej częstość ostrego uszkodzenia nerek po alloHSCT, wyliczona na podstawie bezwzględnych zmian stężenia kreatyniny w surowicy oraz zmniejszenia diurezy, waha się w granicach 11-42%[22], natomiast w przypadku zastosowania kryteriów pRIFLE sięga nawet 84%[23]. Zagadnieniu oceny częstości AKI u dzieci po alloHSCT jest również poświęcona druga z cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską (praca 2). Powyższe rozbieżności w raportowaniu częstości występowania AKI u dzieci poddawanych HSCT wynikają z niejednorodnych metod pomiaru i zastosowania różnych kryteriów diagnostycznych.

Wzrost stężenia kreatyniny w surowicy pacjentów pediatrycznych jest opóźniony w stosunku do realnego czasu uszkodzenia nerek, a także zależny od czynników pozanerkowych, takich jak wiek, płeć, masa mięśniowa, stan nawodnienia i odżywienia pacjenta. Zmniejszenie diurezy jest ważnym czynnikiem diagnostycznym i prognostycznym

u dzieci z podejrzeniem AKI, jednak ocena bilansu płynów może być w tej populacji obarczona błędem ze względu na trudności w pomiarze diurezy u najmłodszych pacjentów, jak również z uwagi na zmienność stopnia ich nawodnienia wskutek stosowania płynoterapii oraz diuretyków.

Tradycyjne metody oceny funkcji nerek, takie jak oznaczenie stężenia kreatyniny w surowicy oraz wartości eGFR, są niedoskonałe, ale powszechnie używane w codziennej praktyce. Ich analiza była podstawą retrospektywnej oceny populacji pacjentów poddawanych alloHSCT, opisanej w drugiej pracy z cyklu tworzącego rozprawę doktorską (praca 2).

3.4. Nowe markery AKI

Wiele przydatnych wskaźników ostrego uszkodzenia nerek zostało przetestowanych w warunkach *in vitro*, *in vivo*, a część z nich była zweryfikowana w toku badań nad AKI w populacji dorosłych po zabiegach kardiochirurgicznych i wśród pacjentów oddziałów intensywnej terapii [24,25]. Niestety tylko nieliczne z potencjalnych markerów AKI zostały zwalidowane w populacji pediatrycznej, natomiast ich ocena u dzieci po alloHSCT należy do rzadkości.

Wśród uznanych markerów uszkodzenia nerek przydatność w zakresie wykrywania AKI u pacjentów po alloHSCT stwierdzono dla NGAL, NAG i L-FABP [26-30], przy czym jedynie NAG był rozpatrywany jako marker ostrego uszkodzenia nerek w populacji pediatrycznej po alloHSCT. MCP-1 jest chemokina, dla której wykazano silną korelację między stężeniem w moczu a stopniem ostrego uszkodzenia nerek u dorosłych pacjentów leczonych cisplatiną, takrolimusem, a także związek ze wzrostem stężenia kreatyniny w surowicy po 5 tygodniach od transplantacji [31]. U dzieci poddawanych HSCT wykazano znaczący wzrost MCP-1 pomiędzy 2. a 4. tygodniem po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych, ale nie korelował on z wystąpieniem AKI [32]. Do innych, potencjalnie przydatnych markerów AKI, należą IL-18, IGFBP-7 czy netrin-1 [33-37], jednak nie badano ich dotychczas u pacjentów poddawanych przeszczepieniu komórek hematopoetycznych.

Powyższe markery zostały omówione w pracy poglądowej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej (praca 1). Natomiast na szczególną uwagę zasługują wskaźniki AKI - cystatyna C, KIM-1 i klasteryna (ang. *clusterin*), przebadane w populacji dzieci po alloHSCT analizowanej w trzeciej publikacji z cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej (praca 3).

3.4.1. Cystatyna C

Cystatyna C to niskocząsteczkowe białko, które jest inhibitorem proteinaz cysteinowych, a także jednym z najbardziej znanych markerów uszkodzenia nerek. Jest produkowana przez jądrzaste komórki organizmu ludzkiego, znajduje się we wszystkich tkankach i płynach ustrojowych. Po przefiltrowaniu przez kłębuszki nerkowe ulega reabsorpcji i degradacji w cewkach proksymalnych. Przy prawidłowej funkcji nerek jej stężenie w moczu jest minimalne, ale w warunkach ich uszkodzenia znacząco wzrasta [38].

Wykazano, że podwyższone stężenie cystatyny C w surowicy koreluje z wystąpieniem AKI u dzieci z oddziałów intensywnej terapii i po operacjach kardiochirurgicznych, a także u dorosłych po HSCT [39,40]. Stężenie tego markera w surowicy jest znacznie lepszym wykładnikiem przesączania kłębuszkowego u dzieci niż wartość kreatyniny. Powyższe dane wskazują na potencjał cystatyny C w wykrywaniu AKI u dzieci po HSCT[41].

Nie jest to jednak wskaźnik o wysokiej specyficzności - jego wzrost obserwowano u dzieci z uszkodzeniem kłębuszków nerkowych w przebiegu chemioterapii, ale także u dorosłych z różnymi nowotworami (białaczka, rak jelita grubego, rak wątrobowokomórkowy, czerniak) i prawidłową funkcją nerek[42,43].

3.4.2. KIM-1

KIM-1 to glikoproteina błonowa obecna w kanalikach nerkowych bliższych, wątrobie i śledzionie. W warunkach fizjologii stężenie tej cząsteczki w moczu jest znikome, ale rośnie istotnie w stanach uszkodzenia nerek, takich jak ostra martwica cewek nerkowych, ostre niedokrwienie oraz wskutek działania substancji nefrotoksycznych. W przebiegu ATN w biopsji nerek wykazano zwiększoną ekspresję KIM-1 w komórkach cewek bliższych [44,45]. Ponadto stwierdzono podwyższone stężenie tej cząsteczki w moczu w przypadku nowotworów wywodzących się z komórek kanalików proksymalnych, jajników i macicy [46].

W populacji pediatrycznej wykazano przydatność tego markera we wczesnej diagnostyce AKI u pacjentów z hipowolemią w przebiegu wstrząsu. KIM-1 w moczu był czulszym wskaźnikiem niż NGAL czy interleukina 18. Jednocześnie stwierdzono jego silną wartość predykcyjną dla konieczności rozpoczęcia terapii nerkozastępczej [47]. KIM-1 okazuje się być także przydatny w ocenie funkcji nerek u pacjentów poddawanych chemioterapii metotreksatem oraz cisplatyną [48]. Jakkolwiek istnieją badania potwierdzające przydatność tego markera w wykrywaniu AKI [49], to brakuje danych na ten temat w populacji dzieci poddawanych przeszczepieniu szpiku kostnego.

3.4.3. Klasteryna

Klasteryna jest białkiem szoku cieplnego. Znajduje się we wszystkich płynach ustrojowych, jej zwiększona ekspresja charakteryzuje tkanki i organy poddane stresowi, np. nerki w fazie niedokrwienia i reperfuzji, występuje też w przypadku niedrożności moczowodu, ostrego odrzucania przeszczepionej nerki czy choroby śródmiąższowej nerek [50-56]. Wykazano jej obecność zarówno w komórkach cewek nerkowych, jak i mezangium. Pełni rolę ochronną i hamuje apoptozę, co zaprezentowano w badaniu in vitro na nerkach mysich [56,57]. Doniesienia na temat klasteryny u ludzi dotyczą jedynie przydatności oceny jej stężenia w moczu u chorych z cukrzycą oraz zastosowania w panelu diagnostycznym przewlekłej choroby nerek [59,60]. Marker ten nie był dotychczas badany w żadnej populacji z AKI ani u pacjentów po allotransplantacji komórek hematopoetycznych.

4. Założenia i cele pracy

Ze względu na niedoskonałość dostępnych metod oceny funkcji nerek w populacji pediatrycznej i specyfikę warunków towarzyszących przeszczepieniu komórek hematopoetycznych, uzasadnionym wydaje się poszukiwanie nowych parametrów uszkodzenia, umożliwiających wykrycie nieprawidłowości wcześniej niż pozwalają na to klasyczne markery upośledzenia funkcji nerek pod postacią wzrostu stężenia kreatyniny w surowicy i obniżenia wskaźnika filtracji kłębuszkowej.

Celem tej pracy jest analiza wpływu zabiegu przeszczepienia komórek hematopoetycznych na funkcję nerek u dzieci, oszacowanie częstości występowania ostrego uszkodzenia nerek z uwzględnieniem różnic między pacjentami poddawany mi temu zabiegowi ze wskazań onkologicznych lub innych, oraz poszukiwanie nowych markerów, umożliwiających postawienie rozpoznania AKI przed spełnieniem klasycznych kryteriów według skali pRIFLE.

4.1. Cele szczegółowe:

1. Retrospektywna ocena funkcji nerek za pomocą eGFR u dzieci przed allotransplantacją komórek hematopoetycznych i do 6 miesięcy po zabiegu w wybranych punktach czasowych (24 godziny, 1, 2, 3, 4, 8 tygodni, 3 i 6 miesięcy po alloHSCT).
2. Ewaluacja częstości występowania AKI zdefiniowanego według kryteriów pRIFLE w powyższych punktach kontrolnych.
3. Analiza porównawcza badanych parametrów u dzieci poddawanych alloHSCT ze wskazań onkologicznych i nieonkologicznych.
4. Prospektywna ewaluacja funkcji nerek przy użyciu eGFR i częstości występowania AKI u dzieci leczonych alloHSCT przed i do 4 tygodni po zabiegu.
5. Ocena stężeń nowego markera, klasteryny oraz uznanych parametrów uszkodzenia cewek nerkowych (KIM-1) i kłębuszków nerkowych (cystatyna C), w surowicy i moczu pacjentów pediatrycznych po alloHSCT, a także ich przydatności we wczesnej diagnostyce AKI.
6. Analiza porównawcza stężeń powyższych parametrów pomiędzy pacjentami onkologicznymi i nieonkologicznymi poddawany mi transplantacji komórek hematopoetycznych.

5. Materiał i metody

5.1. Charakterystyka badanych grup

W badaniu retrospektywnym (praca 2) analizowano dokumentację 178 pacjentów poddanych allotransplantacji komórek hematopoetycznych w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, w latach 2016 - 2018. Do badania włączono 135 dzieci (78 chłopców i 57 dziewcząt) w wieku 2-18 lat (średnia wieku $8,27 \pm 5,14$ lat). Dokonano również podziału ze względu na rodzaj wskazań do przeszczepienia komórek macierzystych.

Pierwszą podgrupę stanowiło 89 osób (53 chłopców i 36 dziewcząt, średnia wieku $9,84 \pm 4,34$ lat) poddanych allotransplantacji ze wskazań onkologicznych (praca 2, Fig.1). 45% badanych z tej grupy zostało zakwalifikowanych do grupy wysokiego ryzyka, u 22% stwierdzono nawrót choroby, a u 17% alloHSCT stanowiło standardowy etap protokołu terapeutycznego. U pozostałych 16% pacjentów transplantacja była wynikiem niepowodzenia wcześniejszej terapii i niemożności osiągnięcia remisji choroby innymi metodami. W większości przypadków (71%) przeszczep pochodził od dawcy niespokrewnionego, w 23% od spokrewnionego, a w 6% był to przeszczep haploidentyczny.

Do drugiej podgrupy zakwalifikowano 46 dzieci (25 chłopców i 21 dziewcząt) z innymi niż nowotworowe wskazania do alloHSCT (praca 2, Fig.2). Średnia wieku tych pacjentów wynosiła $9,16 \pm 4,78$ lat. 72% dzieci otrzymało szpik od dawców niespokrewnionych, 24% od spokrewnionych, a 4% od dawców haploidentycznych.

Badaniem prospektywnym (praca 3) objęto 27 pacjentów (15 dziewcząt i 12 chłopców) poddanych procedurze allotransplantacji komórek hematopoetycznych Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu w 2019 roku. Kryteriami wykluczenia były: wiek poniżej 2. roku życia i powyżej 18 lat, przeszczep autologiczny oraz ponowna transplantacja szpiku. Średni wiek pacjentów wynosił 4,5 roku (mediana 4,5 lat, dolny kwartył 3,1 lat, górny kwartył 8,0 lat). 17 pacjentów zakwalifikowano do alloHSCT z powodu choroby nowotworowej (mediana 6,6 lat, przedział międzykwartyłowy 4,0 - 9,8 lat). u 10 dzieci (mediana wieku 4,5 lat, przedział międzykwartyłowy 3,1 – 7,0 lat) zabieg wykonano z innych wskazań (ciężka anemia aplastyczna, wrodzone niedobory odporności, choroby metaboliczne, genetyczne). W 79% przypadków przeszczep pochodził od dawców niespokrewnionych, w 18% od spokrewnionych, natomiast 3% stanowili dawcy haploidentyczni. Grupę kontrolną stanowiło 18 dzieci (9 dziewczynek, 9 chłopców, mediana wieku 7,8 lat, przedział międzykwartyłowy 7,0 - 9,8 lat) diagnozowanych w Klinice Nefrologii

Pediatrycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z powodu podejrzenia monosymptomatycznego moczenia nocnego, z prawidłową funkcją nerek.

5.2. Metodyka oznaczeń markerów w surowicy i moczu

W badaniu retrospektywnym zgromadzono dane od okresu poprzedzającego kondycjonowanie do 6 miesięcy po alloHSCT. Analizowano stężenia kreatyniny oznaczane w trakcie rutynowych badań w kilku punktach czasowych: przed rozpoczęciem kondycjonowania, dobę po przeszczepieniu, tydzień, 2, 3, 4 i 8 tygodni po, a także 3 miesiące i 6 miesięcy po alloHSCT. Kreatynina była oznaczana metodą Jaffé, eGFR wyliczano ze wzoru Schwartz'a [3]. Stadium ostrego uszkodzenia nerek oceniano w oparciu o kryteria pRIFLE [1,2]. Hiperfiltrację określono jako wartość eGFR przekraczającą 140 ml/min/1,73m² [61].

W badaniu prospektywnym obserwację rozpoczynano w okresie poprzedzającym kondycjonowanie, a następnie dokonywano oznaczeń 24 h po alloHSCT oraz 1, 2, 3 i 4 tygodnie po przeprowadzeniu allotransplantacji.

Podczas rutynowych badań pobierano próbki krwi żyłnej, pozostawiano do skrzepnięcia przez 30 min, a następnie wirowano w temperaturze pokojowej i przechowywano aż do wykonania oznaczeń w temperaturze - 80 st. C. Próbki moczu pobierano z porannej porcji, wirowano, a następnie mrożono w temp. - 80 st. C do czasu wykonania oznaczeń.

Stężenie klasteryny, cystatyny C i KIM-1 oceniano w surowicy i moczu metodą sandwich ELISA, polegającą na wiązaniu antygeny pomiędzy dwiema warstwami przeciwciał. Na 96 - dołkową płytkę opłaszczoną rekombinowanymi przeciwciałami skierowanymi przeciw ludzkiej klasterynie, cystatynie C i KIM-1 nanoszono próbki krwi i moczu, a następnie wychwycone antygeny rozpoznawano przy użyciu odpowiednich przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z peroksydazą chrzanową. W kolejnym kroku dodawano substrat dla peroksydazy chrzanowej, tetrametylobenzydynamę. Natężenie zabarwienia, proporcjonalne do stężenia badanych molekuł, oceniano spektrofotometrycznie czytnikiem fali o długości 450 nm, z korekcją do 550/650 nm. Stosowano komercyjnie dostępne zestawy ELISA firm EIAb i R&D Systems. Wyniki obliczano w oparciu o krzywe standardowe wykreślone przy użyciu wzorcowych stężeń producenta. Wartości stężeń klasteryny, cystatyny C i KIM-1 w moczu były normalizowane do stężeń kreatyniny w moczu.

Wszystkie parametry we krwi i moczu oznaczano przed rozpoczęciem kondycjonowania, jedną dobę po alloHSCT, a następnie tydzień, 2, 3 i 4 tygodnie po zabiegu.

Metodyka oznaczeń podstawowych parametrów biochemicznych nie różniła się od zastosowanej w badaniu retrospektywnym.

Oba badania zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badanie prospektywne było poprzedzone uzyskaniem pisemnej zgody od rodziców lub opiekunów pacjentów oraz od pacjentów w wieku > 16 lat.

5.3. Analiza statystyczna

W badaniu retrospektywnym wyniki dotyczące zmiennych ciągłych zostały przedstawione pod postacią średniej i odchylenia standardowego, zmienne jakościowe pod postacią wartości procentowych. Do porównania danych liniowych wykorzystano analizę wariancji ANOVA i test T-studenta, w przypadku danych nieliniowych różnice między zmiennymi oceniano w oparciu o test chi-kwadrat oraz test Fishera.

W badaniu prospektywnym, ze względu na małą liczebność grupy badanej i, adekwatnie, grupy kontrolnej, wyniki zostały przedstawione w postaci mediany, dolnego i górnego kwartyła. Hipotezę zerową o rozkładzie normalnym odrzucono przy użyciu testu Shapiro-Wilk. Analizy danych dokonano przy użyciu testów nieparametrycznych (Friedmana, Wilcoxon, Kruskala-Wallis, U-Manna-Whitney'a). Zależności między zmiennymi definiowano za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana.

Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 13.3 (Statsoft). Za wartość istotną statystycznie przyjęto $p < 0,05$.

6. Omówienie prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

6.1. Wyniki badania retrospektywnego

Średnie wartości eGFR u dzieci przed transplantacją, niezależnie od wskazań do alloHSCT, przekraczały 90 ml/min/1,73m². U żadnego z pacjentów nie obserwowano przed zabiegiem wartości mniejszych niż 60 ml/min/1,73m². 24 godziny i tydzień po transplantacji występował znaczny wzrost przesączania kłębuszkowego (praca 2, Fig.3, Fig.4). Powrót do wartości sprzed zabiegu miał miejsce w 2. tygodniu w przypadku pacjentów nieonkologicznych i w 3. tygodniu od alloHSCT u pacjentów onkologicznych. Wśród dzieci poddanych transplantacji ze wskazań onkologicznych od 4. tygodnia następowało dalsze sukcesywne obniżanie wartości eGFR aż do 6. miesiąca obserwacji, przy czym różnice te były istotne statystycznie w stosunku do danych wyjściowych (praca 2, Fig.3). Po 6 miesiącach u 12 dzieci wartości eGFR mieściły się między 60 a 89 ml/min/1,73m², a u 2 pacjentów przekroczyły dolną granicę 60 ml/min/1,73m². U pacjentów nieonkologicznych wartości eGFR od 3. tygodnia do 6. miesiąca były porównywalne z wielkością wskaźnika filtracji przed zabiegiem.

Epizody ostrego uszkodzenia nerek według klasyfikacji pRIFLE odnotowano u 54% pacjentów podczas całego okresu obserwacji. Stadium ryzyka (R) wystąpiło co najmniej raz u 58 pacjentów, w tym 41 onkologicznych i 17 nieonkologicznych (praca 2, Tab.1). Stadium uszkodzenia (I) rozwinęło 14 pacjentów (11 onkologicznych i 3 nieonkologicznych) (praca 2, Tab.1). U żadnego z pacjentów nie stwierdzono obniżenia eGFR uprawniającego do rozpoznania stadium niewydolności (F). U pacjentów onkologicznych najwięcej epizodów AKI odnotowano pomiędzy 4. tygodniem a 6. miesiącem po alloHSCT (praca 2, Tab.1). U pacjentów nieonkologicznych największą częstość AKI zaobserwowano w okresie między 4. tygodniem a 3. miesiącem po alloHSCT. W 8. tygodniu stadium R ostrego uszkodzenia nerek wykazano u 31 pacjentów onkologicznych i była to wartość istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do pacjentów nieonkologicznych (8). W żadnym innym punkcie czasowym nie wykazano istotnej różnicy w częstości występowania AKI między badanymi podgrupami.

W trakcie całego okresu obserwacji zmarło 10 pacjentów (0,7%). U jednego z nich zgon w 20. dobie był wynikiem powikłań samego zabiegu, u pozostałych dzieci przyczyną były powikłania infekcyjne i choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi. Żaden z pacjentów nie wymagał leczenia nerkozastępczego w okresie objętym obserwacją.

6.2. Wyniki badania prospektywnego

Wartości eGFR u pacjentów przeszczepianych z przyczyn nieonkologicznych były porównywalne z obserwowanymi w grupie kontrolnej przez cały czas obserwacji z wyjątkiem 1. tygodnia po zabiegu, kiedy istotnie wzrastały. Natomiast pacjenci onkologiczni wykazywali wartości eGFR istotnie wyższe w stosunku do grupy kontrolnej już przed transplantacją i do 3. tygodnia po niej. W każdym punkcie czasowym wartości eGFR w grupie onkologicznej były istotnie wyższe niż wśród dzieci przeszczepianych z innych wskazań.

Mediana wartości eGFR w obu badanych podgrupach przekraczała przez zabiegiem 90 ml/min/1,73m², a u żadnego z dzieci nie wykazano wartości poniżej 60 ml/min/1,73m². U większości pacjentów z onkologicznymi wskazaniami do alloHSCT obserwowano hiperfiltrację, najbardziej nasiloną w 1. tygodniu po zabiegu i utrzymującą się do 3. tygodnia po wykonaniu procedury. Wśród pacjentów nieonkologicznych wartości eGFR >140 ml/min/1,73m² przed transplantacją należały do rzadkości, po zabiegu ich odsetek wzrastał, ale ulegał normalizacji w ostatnim tygodniu obserwacji.

W obu grupach pacjentów stężenia klasteryny, KIM-1 i cystatyny C w moczu były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej, nawet w okresie przed HSCT. Korekta ich wartości w odniesieniu do stężeń kreatyniny w moczu nie zniwelowała tych różnic. W przypadku klasteryny wzrost w czasie 24 h po alloHSCT był najbardziej spektakularny, bo prawie 3-krotny (praca 3, Fig.2). Do 2. tygodnia po zabiegu trwała faza plateau z następowym ponownym wzrostem w 3. tygodniu i spadkiem stężenia po 4 tygodniach od przeszczepienia komórek macierzystych, jednak do poziomu ciągle istotnie wyższego niż przed rozpoczęciem procedury (praca 3, Fig.2). Stężenie KIM-1 w moczu zwiększyło się o 50% po 24 h od alloHSCT, rosło aż do 3. tygodnia, a następnie obniżyło się do wartości przekraczających te obserwowane przed zabiegiem (praca 3, Fig.3). W przypadku cystatyny C w moczu, wzrost stężenia był opóźniony w stosunku do zmian pozostałych parametrów, bo nastąpił dopiero między 2. a 3. tygodniem po transplantacji (praca 3, Fig.4). W 4. tygodniu obserwowano znaczący spadek wartości, choć nadal były one wyższe niż przed alloHSCT (praca 3, Fig.4). Po 4 tygodniach od przeszczepienia stężenia wszystkich markerów w moczu pozostawały podwyższone w stosunku do wartości początkowych.

Stężenia badanych markerów w surowicy pacjentów poddawanych alloHSCT były istotnie wyższe przed zabiegiem niż w grupie kontrolnej (praca 3, Tab.2). W okresie 24 h po przeszczepieniu komórek macierzystych stężenie klasteryny wzrosło 2-krotnie, podczas gdy pozostałych markerów zaledwie o 50-60%. W kolejnych tygodniach obserwowano dalsze

narastanie stężeń do 3. tygodnia w przypadku klasteryny i do 4. tygodnia w przypadku pozostałych biomarkerów. Nie wykazano istotnych różnic w stężeniach badanych parametrów pomiędzy grupami pacjentów onkologicznych i nieonkologicznych w żadnym punkcie czasowym.

Zgodnie z kryteriami pRIFLE ostre uszkodzenie nerek zdiagnozowano u 4 pacjentów (3 z onkologicznymi i 1 z nieonkologicznymi wskazaniami do alloHSCT), u 3 z nich stwierdzono stadium ryzyka R, u 1 stadium uszkodzenia I. Żaden z badanych pacjentów nie wymagał zastosowania terapii nerkozastępczej.

7. Podsumowanie wyników

1. W analizie retrospektywnej u wszystkich dzieci poddawanych allotransplantacji komórek hematopoetycznych wartości eGFR rosły znacząco w 1. dobie po zabiegu i wracały do wartości wyjściowych po 1-2 tygodniach. Od 4. tygodnia do 6. miesiąca obserwowano stopniowe obniżanie się wartości eGFR u pacjentów przeszczepionych ze wskazań onkologicznych.
2. Hiperfiltrację stwierdzano już przed zabiegiem przeszczepienia, częściej u pacjentów onkologicznych (51%) niż u pacjentów nieonkologicznych (21%).
3. W analizowanym okresie 6 miesięcy, AKI według kryteriów pRIFLE rozpoznano u 54% dzieci, a najwyższe wskaźniki zapadalności dotyczyły okresu od 4 tygodni do 3 miesięcy po transplantacji. Z wyjątkiem pojedynczej obserwacji w 8. tygodniu po zabiegu, nie wykazano różnic w częstości występowania AKI między pacjentami onkologicznymi a nieonkologicznymi.
4. W badaniu prospektywnym eGFR u dzieci przeszczepianych ze wskazań onkologicznych był przez cały czas obserwacji znacząco wyższy niż w grupie nieonkologicznej. W obu grupach wartości filtracji kłębuszkowej rosły tuż po zabiegu, a normalizowały się po 3 tygodniach.
5. Stężenia klasteryny, cystatyny C i KIM-1 w surowicy były znacząco wyższe u dzieci poddawanych alloHSCT w porównaniu do grupy kontrolnej już przed zabiegiem, a po zabiegu systematycznie rosły przez cały czas obserwacji.
6. Stężenia klasteryny i KIM-1 w moczu były podwyższone w stosunku do grupy kontrolnej już przed transplantacją, rosły znacząco po zabiegu do 3. tygodnia i pozostawały podwyższone w 4. tygodniu obserwacji. Stężenie cystatyny C, podwyższone przed zabiegiem, ulegało dalszemu wzrostowi dopiero 2 tygodnie po zabiegu i nieznacznemu obniżeniu 4 tygodnie po alloHSCT.
7. Nie wykazano istotnych różnic między stężeniami badanych parametrów w grupach pacjentów onkologicznych i nieonkologicznych.

8. Dyskusja

Ze względu na stale rosnącą liczbę wskazań do transplantacji komórek hematopoetycznych w populacji pediatrycznej, coraz większym wyzwaniem klinicznym stają się profilaktyka oraz wczesna diagnostyka powikłań tego zabiegu [62-65]. Chociaż decydujący wpływ na przeżycie pacjentów mają bezpośrednie skutki stosowanej terapii, takie jak ciężkie infekcje czy uogólniona reakcja immunologiczna pod postacią choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, na uwagę zasługują również powikłania nefrologiczne, znacząco pogarszające rokowanie [66-69].

Potencjalna nefrotoksyczność leków stosowanych podczas HSCT, współwystępowanie infekcji czy nadciśnienia tętniczego, sprzyjają rozwojowi ostrego uszkodzenia nerek w tej populacji [22,23]. Dodatkowymi czynnikami zwiększającymi podatność na AKI są stosowane w przeszłości cykle chemioterapii lub leczenie biologiczne, a także wrodzone defekty metaboliczne, z których część przebiega z pierwotnymi dysfunkcjami cewek nerkowych. Znaczącej roli odpowiedzi immunologicznej i rodzaju stosowanej terapii dowodzi fakt, że częstość występowania AKI jest znacząco wyższa u pacjentów poddawanych allotransplantacji w porównaniu z autologicznym przeszczepieniem szpiku [15].

Bezpośrednią konsekwencją powyższych uwarunkowań są ściśle zdefiniowane zalecenia odnośnie zapobiegania rozwojowi AKI, ujęte w protokołach postępowania podczas i po zabiegu transplantacji komórek macierzystych. Odpowiednie nawodnienie pacjenta (podaż dożylna płynów w ilości 3 l/m² p.c./dobę) i adekwatne forsowanie diurezy przy użyciu diuretyków pętlowych przez pierwsze 3 tygodnie po HSCT stanowi w większości przypadków skuteczną profilaktykę, o czym świadczy fakt, że w badanym materiale nie odnotowano ani jednego przypadku wskazań do dializoterapii w 6-miesięcznym okresie obserwacji.

Brak podstaw do rozpoznania stadium 3 AKI nie wyklucza jednak istnienia cech uszkodzenia struktur nerkowych, czego dowodem było zakwalifikowanie w analizie retrospektywnej 46% pacjentów onkologicznych i 37% pacjentów nieonkologicznych do grupy R oraz 12% pacjentów onkologicznych i 1% nieonkologicznych do grupy I w okresie sześciu miesięcy po alloHSCT. W badaniu prospektywnym odsetek ten był zdecydowanie niższy, bo dotyczył odpowiednio 11% i 10% dzieci w stadium R oraz 5% pacjentów onkologicznych w stadium I, ale w zdecydowanie krótszym okresie obserwacji, obejmującym cztery pierwsze tygodnie po zabiegu.

Rozbieżności dotyczące częstości występowania poszczególnych stadiów AKI w zależności od czasu obserwacji mogą wynikać z opisanej wcześniej specyfiki postępowania

z pacjentem we wczesnym okresie potransplantacyjnym, ale są też pochodną trudności w ocenie stopnia nasilenia ewentualnych zaburzeń, które generuje różnorodność definicji AKI.

Chociaż obowiązujące klasyfikacje KDIGO, AKIN i pRIFLE operują zbliżonymi do siebie kryteriami, rozróżniającymi trzy podstawowe stadia ostrego uszkodzenia nerek, to badania porównujące wyniki uzyskane na podstawie poszczególnych skal wykazują różnice sięgające nawet kilkudziesięciu procent [12-14]. Wszyscy autorzy zgodnie podkreślają, że stężenie kreatyniny w surowicy, a więc i wyliczony na jej podstawie eGFR, są parametrami zależnymi od wielu czynników zewnętrznych i zmieniającymi się stosunkowo późno w relacji do zaistniałego uszkodzenia w obrębie nerek.

Zależność stężenia kreatyniny od masy mięśniowej i stanu nawodnienia nabiera szczególnego znaczenia w populacji dzieci po przeszczepieniu szpiku, kiedy to katabolizm, żywienie pozajelitowe i intensywne podaż płynów zaburzają bilans wodny i metaboliczny, tym samym modyfikując wartości badanych parametrów. Efektem tych działań jest hiperfiltracja, obserwowana w badanym materiale u pacjentów nieonkologicznych do 2. tygodnia, a u dzieci przeszczepianych ze wskazań onkologicznych - do 3. tygodnia po HSCT. Jednak zastanawiającym okazał się fakt wysokiego odsetka pacjentów z hiperfiltracją również przed zabiegiem. Wobec wyraźnej dysproporcji między pacjentami nieonkologicznymi a onkologicznymi na korzyść tych ostatnich, obecność hiperfiltracji należy najprawdopodobniej przypisać wpływowi wcześniejszego leczenia. Jest to zgodne z doniesieniami w literaturze na temat występowania hiperfiltracji w populacji chorych poddawanych chemioterapii i wzrostu natężenia tego zjawiska wraz z kolejnymi cyklami leczenia [70]. Jednocześnie podnoszona jest kwestia znaczenia hiperfiltracji jako wczesnego markera zagrażającego uszkodzenia nerek u tych pacjentów [71]. Ta sugestia wydaje się znajdować potwierdzenie w dalszych wynikach badań własnych, ujawniających podwyższone stężenia markerów uszkodzenia w populacji dzieci poddawanych alloHSCT.

Wprowadzenie w 2013 roku do klasyfikacji AKI markerów uszkodzenia było następstwem nowego spojrzenia na patomechanizmy odpowiedzialne za ostre uszkodzenie nerek, uwzględniającego równorzędną rolę upośledzenia funkcji kłębuszków nerkowych i cewek nerkowych [72]. Za markery funkcji uznano stężenie kreatyniny i wielkość diurezy, do kategorii potencjalnych parametrów uszkodzenia włączono szereg wskaźników, począwszy od cząsteczek zwiększających swoją ekspresję bądź uwalnianych przez nerki wskutek ich uszkodzenia, poprzez molekuly filtrowane przez nerki, aż do substancji przez nie reabsorbowanych [72]. Wśród kandydatów znalazły się m.in. NGAL, IL-18 oraz klasteryna, cystatyna C i KIM-1, oceniane w materiale własnym. Podczas 10. konferencji Acute Dialysis

Quality Initiative wyodrębniło cztery nowe kategorie dywersyfikujące rodzaj obserwowanych zaburzeń. Pierwsza opisuje zachowaną funkcję kłębuszków i cewek, czyli brak AKI, druga definiuje obecność uszkodzenia cewek nerkowych przy zachowanej funkcji filtracyjnej kłębuszków jako subkliniczne AKI. Upośledzenie filtracji przy braku cech uszkodzenia cewek zyskało miano czynnościowego AKI, natomiast współistnienie cech uszkodzenia filtracji i upośledzenia funkcji cewek zostało nazwane typem mieszanym AKI. Zasadniczą rolę w tej definicji odgrywa potencjalna odwracalność zmian – czynnościowe i subkliniczne postaci AKI mogą ustąpić lub ewoluować w stronę zmian mieszanych, a w mieszanym AKI może dojść do regresji zmian w cewkach i/lub w kłębuszkach nerkowych [72].

Nowa klasyfikacja pozwala dzięki kryterium subklinicznego AKI rozpoznać cechy uszkodzenia nerek zanim dojdzie do podwyższenia stężenia kreatyniny w surowicy. Przydatność markerów uszkodzenia została potwierdzona w wielu pracach doświadczalnych nad AKI, udowodniono również, że równoczesna ocena markerów czynnościowych i uszkodzenia poprawia wczesną wykrywalność AKI u pacjentów poddawanych operacjom kardiochirurgicznym [73-76]. Natomiast ciągle mało jest badań wykorzystujących markery uszkodzenia wśród dzieci z AKI, co może wynikać m.in. z braku dostępności wartości referencyjnych poszczególnych biomarkerów dla tej grupy wiekowej [77]. W populacji pediatrycznej także dominują badania dotyczące pacjentów kardiologicznych, widać również wyraźną tendencję do nieinwazyjnego oznaczania markerów uszkodzenia w moczu [78].

Wśród dzieci poddawanych zabiegowi transplantacji komórek hematopoetycznych została dotychczas podjęta tylko jedna próba jednoczesnej oceny markerów funkcji i uszkodzenia nerek w kontekście zagrażającego AKI w okresie do 28 dni po zabiegu i odległych powikłań w ciągu pierwszego roku od HSCT [79]. Prospektywne badanie przeprowadzono na grupie 80 dzieci, wśród których większość, w przeciwieństwie do materiału własnego, stanowili pacjenci przeszczepiani ze wskazań nieonkologicznych (70%). Autorzy definiowali AKI oceniając w odstępach tygodniowych trzy parametry: stężenie kreatyniny w surowicy, eGFR wyliczany na podstawie stężenia cystatyny C w surowicy oraz stężenie NGAL w moczu. Stadium łagodnego AKI oznaczało wzrost stężenia kreatyniny o $\geq 50\%$ lub obniżenie eGFR o $\leq 30\%$ lub stężenie NGAL ≥ 50 ng/mL. Kryteria ciężkiego AKI obejmowały wzrost stężenia kreatyniny o $\geq 100\%$ lub obniżenie eGFR o $\leq 50\%$ lub stężenie NGAL ≥ 150 ng/mL. Dodatkowo wyróżniono 7 podtypów AKI, w zależności od zaistnienia izolowanych zmian dotyczących jednego markera (np. NGAL AKI), kombinacji dwóch z nich (np. kreatynina + cystatyna C AKI) lub wszystkich trzech (kreatynina + cystatyna C + NGAL

AKI). W całym okresie obserwacji podwyższone stężenia NGAL w kombinacji ze zwiększeniem stężenia kreatyniny obserwowano u wszystkich pacjentów, a obniżenie eGFR wyliczonego na podstawie stężenia cystatyny C u 78 z 80 dzieci. Występowanie izolowanego podwyższenia stężenia NGAL (NGAL AKI) nie korelowało z wiekiem, płcią, rodzajem wskazania do HSCT ani wcześniejszą terapią, jednak znaczny wzrost wskaźnika był czynnikiem prognostycznym wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, dalszego pogorszenia funkcji nerek i dializoterapii, w ciągu roku od przeprowadzenia transplantacji. Ryzyko GvHD wzrastało również w przypadku AKI definiowanego przez zmiany dwóch dowolnych markerów, a najwyższe było wśród dzieci ze zmianami wszystkich parametrów.

W materiale własnym wzrost parametrów uszkodzenia (klasteryna, KIM-1, cystatyna C w moczu) i funkcji (cystatyna C w surowicy) był również zjawiskiem powszechnym, chociaż zróżnicowanym w czasie i zależnym od lokalizacji. Stężenia wszystkich wskaźników w surowicy rosły od pierwszej doby po zabiegu, chociaż w przypadku klasteryny różnice były największe, a trend wzrostu z tygodnia na tydzień utrzymywał się do końca obserwacji. Stężenia KIM-1 i cystatyny C wykazywały tendencję do stabilizacji odpowiednio w 1. i 2. tygodniu po HSCT. Utrzymywanie się podwyższonych wartości markerów wydaje się potwierdzać amerykańskie obserwacje, chociaż autorzy nie analizowali ich stężeń jako zmiennych liniowych, ale traktowali jak zmienne jakościowe służące do klasyfikacji pacjentów w kategoriach brak AKI – łagodne AKI – ciężkie AKI. Zbieżność w obu pracach dotyczyła jednak narastających wartości eGFR po HSCT, z charakterystycznym pikiem sygnalizującym hiperfiltrację tuż po zabiegu i łagodną tendencją spadkową do końca obserwacji. Częściej natomiast stwierdzany w amerykańskim materiale wzrost stężenia kreatyniny mógł wynikać z zastosowania bardziej dokładnej metody pomiaru tego parametru.

NGAL był jedynym parametrem oznaczanym w moczu przez Benoit i wsp., jednak autorzy nie opisywali dynamiki zmian jego stężeń w czasie, analizując tylko konkretne punkty odcięcia [79]. W materiale własnym jednoczesna ocena w moczu i surowicy dotyczyła wszystkich potencjalnych markerów uszkodzenia. Podwyższenie w moczu stężeń klasteryny i KIM-1 następowało w pierwszej dobie po zabiegu i utrzymywało się na stabilnym poziomie do 3. tygodnia, kiedy pojawiał się kolejny pik, a następnie obniżenie wartości w 4. tygodniu obserwacji. Zmiany te ponownie były bardziej nasilone w przypadku klasteryny niż KIM-1. Stężenia cystatyny C jako jedyne pozostały niezmiennione w moczu do 1. tygodnia po transplantacji, po 2 tygodniach następował ich wzrost, a w 4. tygodniu ponowne obniżenie wartości markera. Czasowe rozbieżności w dynamice wzrostu stężeń markerów były

najprawdopodobniej związane ze źródłem pochodzenia poszczególnych molekuł pojawiających się w moczu.

Cystatyna C jest małą cząsteczką (13 kDa), swobodnie filtrowaną przez kłębuszki nerkowe, w przeciwieństwie do klasteryny (70-80 kDa) i KIM-1 (90-110 kDa). Opóźniony w stosunku do podwyższonego stężenia w surowicy wzrost wartości cystatyny C w moczu wskazuje więc na jej systemowe pochodzenie i jest wynikiem zwiększonej filtracji cząsteczki przez nerki. Inaczej dzieje się w przypadku klasteryny i KIM-1 - znaczący wzrost stężeń w moczu już w pierwszej dobie po zabiegu sugeruje ich nerkowe pochodzenie. Obie cząsteczki są wydzielane w odpowiedzi na stres, przy czym za sekrecję KIM-1 odpowiadają cewki proksymalne, a klasteryna jest wydzielana przez komórki cewek proksymalnych, dystalnych i mezangium, co może świadczyć o jej przydatności zarówno jako markera upośledzenia funkcji filtracyjnej, jak i uszkodzenia cewek nerkowych [54,72]. Potwierdzenie skuteczności klasteryny we wczesnej diagnostyce subklinicznego i czynnościowego AKI będzie wymagać kolejnych badań, ale jest ona już testowana w zestawach markerów oceniających funkcję nerek [60]. Badania eksperymentalne wskazują też na rolę klasteryny i KIM-1 w zapobieganiu apoptozie i włóknieniu, co mogłoby sugerować ich potencjał jako wskaźników progresji AKI do przewlekłej choroby nerek i otwiera nowy rozdział badań nad ich przydatnością jako markerów rokowniczych [45,49,50,58,80].

Obserwowana w badaniu retrospektywnym i prospektywnym powszechność cech uszkodzenia komórek po transplantacji, zarówno w obrębie nerek, jak i w krążeniu, była zaskakującym odkryciem. Podwyższone stężenia badanych markerów i obecność hiperfiltracji wydawały się jednak wytłumaczalne w kontekście zastosowanej terapii o potencjalnej nefrotoksyczności i współistniejących czynników ryzyka rozwoju AKI. Bardziej niepokojącym okazało się jednak stwierdzenie cech uszkodzenia nerek już przed zabiegiem, nie opisane dotąd w żadnej publikacji. Przyczyną braku wcześniejszych doniesień mógł być fakt, że badania pacjentów poddawanych HSCT nigdy nie uwzględniały porównania analizowanych parametrów z ich wartościami w odpowiednio dobranej grupie kontrolnej. Mylne przekonanie o nienaruszonej funkcji nerek u pacjentów przygotowujących do zabiegu przeszczepienia hematopoetycznych komórek macierzystych mogło opierać się na prawidłowych, a nawet podwyższonych wartościach eGFR.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że ewaluacja funkcji nerek u dzieci jedynie za pomocą analizy ich zdolności filtracyjnej może być niewystarczająca zarówno przed zabiegiem HSCT, jak i w okresie potransplantacyjnym. Dlatego nowe markery,

a w szczególności klasteryna, mogą stanowić skuteczne narzędzie weryfikacji, pozwalające na wczesne wykrycie cech uszkodzenia nerek w tej populacji.

9. Wnioski

1. Częstość występowania AKI u dzieci po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych jest niezależna od wskazań do transplantacji i rośnie z czasem, osiągając najwyższe wartości między 4. tygodniem a 3. miesiącem po zabiegu.
2. Wysoki odsetek dzieci z wyjściową hiperfiltracją, ulegający dodatkowo zwiększeniu po alloHSCT, utrudnia adekwatną ocenę funkcji nerek zarówno przed zabiegiem, jak i we wczesnym okresie poprzszczepowym.
3. eGFR jest jedynym markerem przydatnym w dywersyfikacji pacjentów onkologicznych i nieonkologicznych.
4. Cechy subklinicznego uszkodzenia nerek, pod postacią podwyższonych w stosunku do grupy kontrolnej stężeń klasteryny, cystatyny C i KIM-1 w surowicy i moczu, są obecne u dzieci już przed alloHSCT i ulegają nasileniu po zabiegu.
5. Klasteryna w moczu może okazać się przydatnym markerem subklinicznego AKI, wyprzedzającym w czasie zmiany funkcji filtracyjnej nerek i umożliwiającym wczesne rozpoznanie dysfunkcji cewek nerkowych.
6. Ocena funkcji nerek u dzieci poddawanych zabiegowi przeszczepienia komórek hematopoetycznych powinna obejmować analizę klasycznych parametrów filtracji kłębuszkowej, wzbogaconą o oznaczenia nowych markerów uszkodzenia.

10. Piśmiennictwo

1. Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL, Washburn KK, Jefferson LS, Goldstein SL. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007; 71: 1028-1035.
2. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A. Acute Kidney Injury Network: Acute kidney injury network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007; 11: R31.
3. Schwartz G.J., Muñoz A., Schneider M.F. i wsp.: New equations to estimate GFR in children with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20: 629–637.
4. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl.* 2012; 2: 1-138.
5. Levey AS, Eckardt KU, Dorman NM, Christiansen SL, Hoorn EJ, Ingelfinger JR, et al. Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int* 2020; 97: 1117-1129.
6. Parikh RV, Tan TC, Salyer AS, et al. Community-Based Epidemiology of Hospitalized Acute Kidney Injury. *Pediatrics* 2020; 146.
7. Vachvanichsanong P, Dissaneewate P, Lim A, McNeil E. Childhood acute renal failure: 22-year experience in a university hospital in southern Thailand. *Pediatrics* 2006; 118: e786.
8. Gubb S, Holmes J, Smith G, et al. Acute Kidney Injury in Children Based on Electronic Alerts. *J Pediatr* 2020; 220:14.
9. Sandokji I, Yamamoto Y, Biswas A, et al. a Time-Updated, Parsimonious Model to Predict AKI in Hospitalized Children. *J Am Soc Nephrol* 2020; 3:1348.
10. Bhojani S, Stojanovic J, Melhem N, et al. The Incidence of Paediatric Acute Kidney Injury Identified Using an AKI E-Alert Algorithm in Six English Hospitals. *Front Pediatr* 2020; 8: 29.
11. Xu X, Nie S, Zhang A, et al. Acute Kidney Injury among Hospitalized Children in China. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; 13:1791.
12. Sutherland SM, Byrnes JJ, Kothari M, et al. AKI in hospitalized children: Comparing the pRIFLE, AKIN, and KDIGO definitions. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10 (4): 554-561.

13. Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med* 2015; 41: 1411-23.
14. Wang L, McGregor TL, Jones DP, et al. Electronic health record-based predictive models for acute kidney injury screening in pediatric inpatients. *Pediatr Res* 2017; 82: 465.
15. Kemmner S, Verbeek M, Heemann U. Renal dysfunction following bone marrow transplantation. *J Nephrol*. 2017; 30(2): 201–209.
16. Perazella MA. Onco-nephrology: Renal toxicities of chemotherapeutic agents. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012; 7(10): 1713–1721.
17. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: Adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2014; 49: 469–476.
18. Motoyoshi Y, Endo A, Takagi M, et al. Graft versus host disease-dependent renal dysfunction after hematopoietic stem cell transplantation. *CEN Case Rep*. 2014; 3(2): 202–205.
19. Fan CQ, Crawford JM. Sinusoidal obstruction syndrome (hepatic veno-occlusive disease). *J Clin Exp Hepatol*. 2014; 4(4): 332–346.
20. Rosenthal J. Hematopoietic cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Blood Med*. 2016; 7: 181–186.
21. Abudayyeh A, Hamdi A, Lin H, et al. Symptomatic BK virus infection is associated with kidney function decline and poor overall survival in allogeneic hematopoietic stem cell recipients HHS Public Access. *Am J Transplant*. 2016; 16(5): 1492–1502.
22. Didsbury MS, Mackie FE, Kennedy SE. a systematic review of acute kidney injury in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant*. 2015; 19(5): 460–470.
23. Kizilbash SJ, Kashtan CE, Chavers BM, Cao Q, Smith AR. Acute kidney injury and the risk of mortality in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016; 22(7): 1264–1270.
24. Mutlu H, Gündüz E, Titiz TA, Küçükçetin İÖ. Investigation of AKI with Early Biomarkers After Cardiac Surgery. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2020; 35(5): 722-731.

25. Amaral Pedroso L, Nobre V, Dias Carneiro de Almeida C, da Silva Praxedes MF, Sernizon Guimarães N, Simões E Silva AC, Parreiras Martins MA. Acute kidney injury biomarkers in the critically ill. *Clin Chim Acta*. 2020; 508: 170-178.
26. Taghizadeh-Ghehi M, Sarayani A, Ashouri A, Ataei S, Moslehi A, Hadjibabaie M. Urine neutrophil gelatinase associated lipocalin as an early marker of acute kidney injury in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Ren Fail*. 2015; 37(6): 994–998.
27. Fink J, Cooper M, Burkhart K, McDonald G, Zagerr Fink RJ, McDonald GB, Zager RA. Marked enzymuria after bone marrow transplantation: a correlate of veno-occlusive disease-induced hepatorenal syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 6(6): 1655–1656.
28. Volkan Hazar MD, Ozgul Gungor MD, Ayfer Gur Guven MD, et al. Renal function after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 53(2): 97–202.
29. Morito T, Ando M, Tsuchiya K, Nitta K. Early identification of acute kidney injury after hematopoietic stem cell transplantation by the measurement of urinary biomarkers. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 2011; 53(8): 1150–1158.
30. Shingai N, Morito T, Najima Y, et al. Urinary liver-type fatty acid-binding protein linked with increased risk of acute kidney injury after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20(12): 2010–2014.
31. Moledina DG, Isguven S, McArthur E, et al. Plasma monocyte chemotactic protein-1 is associated with acute kidney injury and death after cardiac operations. *Ann Thorac Surg*. 2017; 104(2): 613–620.
32. Dicarlo J, Agarwal-Hashmi R, Shah A, et al. Cytokine and chemokine patterns across 100 days after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2014; 20(3): 361–369.
33. Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, et al. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int*. 2006; 70(1): 199–203.
34. Nisula S, Yang R, Poukkanen M, et al. Predictive value of urine interleukin-18 in the evolution and outcome of acute kidney injury in critically ill adult patients. *Br J Anaesth*. 2015; 114(3): 460–468.
35. Aregger F, Uehlinger DE, Witowski J, et al. Identification of IGFBP-7 by urinary proteomics as a novel prognostic marker in early acute kidney injury. *Kidney Int*. 2014; 85(4): 909–919.

36. Rajasundari A, Pays L, Mehlen P, Ramesh G. Netrin-1 overexpression in kidney proximal tubular epithelium ameliorates cisplatin nephrotoxicity. *Lab Investig.* 2011; 91(12): 1717–1726.
37. Ramesh G, Krawczeski CD, Woo JG, Wang Y, Devarajan P. Urinary netrin-1 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5(3): 395–401.
38. Mussap M, Plebani M, Bokenkamp A. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences Biochemistry and Clinical Role of Human Cystatin C Biochemistry and Clinical Role of Human Cystatin C. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41: 5–6.
39. Nakhjavan-Shahraki B, Yousefifard M, Ataei N, et al. Accuracy of cystatin C in prediction of acute kidney injury in children; serum or urine levels: Which one works better? a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol.* 2017; 18(1): 120.
40. Volpon LC, Sugo EK, Carlotti APCP. Diagnostic and prognostic value of serum cystatin C in critically ill children with acute kidney injury. *Pediatr Crit Care Med.* 2015; 16(5): e125–131.
41. Muto H, Ohashi K, Ando M, Akiyama H, Sakamaki H. Cystatin C level as a marker of renal function in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2010; 91(3): 471–477.
42. Kos J, Lah TT. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: Target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep.* 1998; 5(6): 1349–1361.
43. Lah TT, Kos J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem.* 1998; 379: 125–130.
44. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002; 62: 237–244.
45. Huang Y, Don-Wauchope AC. The clinical utility of kidney injury molecule-1 in the prediction, diagnosis and prognosis of acute kidney injury: a systematic review. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2011; 10(4): 260–271.
46. Marchewka Z, Tacik A, Piwowar A. KIM-1 and NGAL as potential biomarkers for the diagnosis and cancer progression. *Postepy Hig Med Dosw.* 2016; 70: 329–336.
47. Westhoff JH, Seibert FS, Waldherr S, et al. Urinary calprotectin, kidney injury molecule-1, and neutrophil gelatinase-associated lipocalin for the prediction of adverse outcome in pediatric acute kidney injury. *Eur J Pediatr.* 2017; 176(6): 745–755.

48. Carvalho Pedrosa D, Macedo De Oliveira Neves F, Meneses GC, et al. Urinary KIM-1 in children undergoing nephrotoxic antineoplastic treatment: a prospective cohort study. *Pediatr Nephrol.* 2015; 30(12): 2207–2213.
49. Shao X, Tian L, Xu W, et al. Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(1): e84131.
50. Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(5): 427–31.
51. Guan Q, Alnasser HA, Nguan CY, Du C. From humans to experimental models: The cytoprotective role of clusterin in the kidney. *Med Surg Urol.* 2014; 3: 134.
52. Rosenberg ME, Paller MS. Differential gene expression in the recovery from ischemic renal injury. *Kidney Int.* 1991; 39(6): 1156–61.
53. Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest.* 1994; 93(5): 2175–88.
54. Zhou W, Guan Q, Kwan CC, Chen H, Gleave ME, Nguan CY, et al. Loss of clusterin expression worsens renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 298(3): F568–78.
55. Dvergsten J, Manivel JC, Correa-Rotter R, Rosenberg ME. Expression of clusterin in human renal diseases. *Kidney Int.* 1994; 45(3): 828–35.
56. Sansanwal P, Li L, Sarwal MM. Inhibition of intracellular clusterin attenuates cell death in nephropathic cystinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26(3): 612–25.
57. Murphy BF, Davies DJ, Morrow W, d’Apice AJ. Localization of terminal complement components S-protein and SP-40,40 in renal biopsies. *Pathology.* 1989; 21(4): 275–8.
58. Guo J, Guan Q, Liu X, Wang H, Gleave ME, Nguan CYC, Du C. Relationship of clusterin with renal inflammation and fibrosis after the recovery phase of ischemia-reperfusion injury. *BMC Nephrol.* 2016; 17: 133.
59. Kim SS, Song SH, Kim JH, Jeon YK, Kim BH, Kang MC, Chun SW, Hong SH, Chung M, Kim YK et al. Urine clusterin/apolipoprotein J is linked to tubular damage and renal outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Endocrinol.* 2017; 87: 156–164.
60. Watson D, Yang J, Sarwal RD, Sigdel TK, Liberto J, Damm I, Louie V, Sigdel S, Livingstone D, Soh K et al. a novel multi-biomarker assay for non-invasive quantitative monitoring of kidney injury. *J. Clin. Med.* 2019; 8: 499.

61. Cachat F, Combescure C, Cauderay M, Girardin E, Chehade H. a systematic review of glomerular hyperfiltration assessment and definition in the medical literature. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; 10: 382–389.
62. Slatter MA, Gennery AR. Hematopoietic cell transplantation in primary immunodeficiency - conventional and emerging indications. *Exp. Rev. Clin. Immunol.* 2008; 14: 103–114.
63. Xu L, Chen H, Chen J, Han M, Huang H, Lai Y, Liu D, Liu Q, Liu T, Jiang M et al. The consensus on indications, conditioning regimen, and donor selection of allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological diseases in China - recommendations from the Chinese Society of Hematology. *J. Hematol. Oncol.* 2018; 11: 1–17.
64. Sureda A, Bader P, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, Falkenburg JHF, Farge-Bancel D, Gennery A, Kroger N et al. Indications for allo- and auto-HSCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: Current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50: 1037–1056.
65. Hołowiecki J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol. Arch. Intern. Med.* 2008; 118: 658–663.
66. Hierlmeier S, Eyrich M, Wöfl M, Schlegel P-G, Wiegering V. Early and late complications following hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients - a retrospective analysis over 11 years. *PLoS ONE* 2018; 13: e0204914.
67. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Infect. Chemother.* 2016; 22: 505–551.
68. Koh K-N, Sunkara A, Kang G, Sooter A, Mulrooney DA, Triplett B, Onder AM, Bissler J, Cunningham LC. Acute Kidney Injury in Pediatric Patients Receiving Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Incidence, Risk Factors, and Outcomes. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2018; 24: 758–764.
69. Raina R, Herrera N, Krishnappa V, Sethi SK, Deep A, Kao WM, Bunchman T, Abu-Arja R. Hematopoietic stem cell transplantation and acute kidney injury in children: a comprehensive review. *Pediatr. Transplant.* 2017; 21: e12935.
70. Kwatra NS, Meany HJ, Ghelani SJ, Zahavi D, Pandya N, Majd M. Glomerular hyperfiltration in children with cancer: Prevalence and a hypothesis. *Pediatr. Radiol.* 2016; 47: 221–226.

71. Tiburcio FR, Rodrigues KE, Belisario AR, Simoes-e-Silva AC. Glomerular hyperfiltration and beta-2 microglobulin as biomarkers of incipient renal dysfunction in cancer survivors. *Future Sci.* 2018; 4: FSO333.
72. Murray PT, Mehta RL, Shaw A, Ronco C, Endre ZH, Kellum JA, Chawla LS, Cruz DN, Ince C, Okusa MD et al. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: Report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int.* 2014; 85: 513–521.
73. Parikh CR, Mansour SG. Perspective on clinical application of biomarkers in AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28(6): 1677–1685.
74. Koyner JL, Coca SG, Thiessen-Philbrook H, Patel UD, Shlipak M, Garg AX, et al. Urine biomarkers and perioperative acute kidney injury: the impact of preoperative estimated GFR. *Am J Kidney Dis.* 2015; 66(6): 1006-1014.
75. Fuhrman D, Nguyen L, Hindes M, Kellum JA. Baseline tubular biomarkers in young adults with congenital heart disease as compared to healthy young adults: detecting subclinical kidney injury. *Congenit Heart Dis.* 2019; 14(6): 963-967.
76. Basu RK, Wong HR, Krawczeski CD, Wheeler DS, Manning PB, Chawla LS, Devarajan P, Goldstein SL. Combining functional and tubular damage biomarkers improves diagnostic precision for acute kidney injury after cardiac surgery. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 64: 2753–2762.
77. Bennett MR, Nehus E, Haffner Ch, Ma Q, Devarajan P. Pediatric reference ranges for acute kidney injury biomarkers. *Pediatr Nephrol.* 2015; 30: 677-685.
78. Nehus E, Kaddourah A, Bennett M, Pyles O, Devarajan P. Subclinical kidney injury in children receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs after cardiac surgery. *J Pediatr* 2017; 189: 175-180.
79. Benoit SW, Dixon BP, Goldstein SL, Bennett MR, Lane A, Louder DT, Rotz SJ, Gloude NJ, Lake KE, Litts B et al. a novel strategy for identifying early acute kidney injury in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2019; 54: 1453–146.
80. Humphreys BD, Xu F, Sabbiseti V, Grgic i, Naini SM, Wang N, Chen G, Xiao S, Patel D, Henderson JM et al. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J. Clin. Investig.* 2013; 123: 4023–4035.

11. Streszczenie

Ostre uszkodzenie nerek jest częstym powikłaniem towarzyszącym przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych w populacji pediatrycznej. W praktyce klinicznej ocena funkcji nerek bazuje na wartości stężenia kreatyniny w surowicy i wyliczonym na jej podstawie wskaźniku filtracji kłębuszkowej eGFR. Kreatynina jest jednak późnym markerem uszkodzenia, uwarunkowanym m.in. stopniem nawodnienia pacjenta czy jego masą mięśniową. Ponadto częstość rozpoznania ostrego uszkodzenia nerek zależy od precyzyjnego zdefiniowania AKI na podstawie jednej z trzech obowiązujących klasyfikacji. Specyfika warunków towarzyszących transplantacji szpiku wymaga wczesnej diagnostyki ostrego uszkodzenia nerek, dlatego uzasadnionym wydaje się poszukiwanie nowych parametrów, umożliwiających wykrycie nieprawidłowości wcześniej niż pozwalają na to wzrost stężenia kreatyniny w surowicy i obniżenie wskaźnika filtracji kłębuszkowej.

Celem tej pracy była ocena wpływu zabiegu przeszczepienia komórek hematopoetycznych na funkcję nerek u dzieci, analiza częstości występowania ostrego uszkodzenia nerek z uwzględnieniem różnic między pacjentami poddawanyymi temu zabiegowi ze wskazań onkologicznych lub innych, oraz poszukiwanie wczesnych markerów, umożliwiających postawienie rozpoznania przed spełnieniem klasycznych kryteriów AKI według skali pRIFLE. Zaplanowano retrospektywną analizę wartości eGFR u dzieci poddawanych alloHSCT, począwszy od wyjściowej oceny funkcji nerek przed zabiegiem, poprzez kontrolę po 24 godzinach, 1, 2, 3, 4, 8 tygodniach, 3 i 6 miesiącach po transplantacji. Badanie prospektywne uwzględniało ocenę uznanych markerów uszkodzenia nerek (KIM-1, cystatynę C), wzbogaconą o nowy parametr funkcji cewek nerkowych, klasterynę, nie analizowaną dotąd w populacji pacjentów po przeszczepieniu szpiku.

Do badania retrospektywnego włączono 135 dzieci poddanych allotransplantacji komórek hematopoetycznych w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, w latach 2016 - 2018. U 89 z nich zabieg wykonano ze wskazań onkologicznych, u 46 dzieci – z innych przyczyn.

Badaniem prospektywnym objęto 27 pacjentów poddanych procedurze allotransplantacji komórek hematopoetycznych w Klinice Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu w 2019 roku. Grupę kontrolną stanowiło 18 dzieci diagnozowanych w Klinice Nefrologii Pediatrycznej Uniwersytetu Medycznego

we Wrocławiu z powodu podejrzenia monosymptomatycznego moczenia nocnego, z prawidłową funkcją nerek.

W obu grupach oceniano wielkość wskaźnika filtracji kłębuszkowej eGFR i dokonywano klasyfikacji AKI przy użyciu kryteriów pRIFLE. W grupie prospektywnej dodatkowo oceniano w surowicy i moczu stężenia nowego potencjalnego markera uszkodzenia - klasteryny, w porównaniu do uznanych parametrów jak KIM-1 czy cystatyna C.

Ocena retrospektywna poszczególnych markerów rozpoczynała się przed zabiegiem i obejmowała okres do 6. miesiąca po transplantacji. Stężenia klasteryny, KIM-1 i cystatyny C były oceniane przed transplantacją, 24 godziny po zabiegu i w odstępach tygodniowych do 4. tygodnia po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek macierzystych.

W analizie retrospektywnej hiperfiltrację stwierdzano już przed zabiegiem przeszczepienia szpiku, częściej u pacjentów onkologicznych niż u pacjentów nieonkologicznych. U wszystkich dzieci poddawanych allotransplantacji komórek hematopoetycznych wartości eGFR rosły znacząco w 1. dobie po zabiegu i wracały do wartości wyjściowych po 1-2 tygodniach. U pacjentów przeszczepionych ze wskazań onkologicznych obserwowano stopniowe obniżanie się wartości eGFR od 4. tygodnia do 6. miesiąca po alloHSCT. Podczas 6-miesięcznego okresu obserwacji, AKI według kryteriów pRIFLE rozpoznano u 54% dzieci. Najwyższe wskaźniki zapadalności dotyczyły okresu od 4 tygodni do 3 miesięcy po transplantacji. Poza pojedynczą obserwacją w 8. tygodniu po zabiegu, nie wykazano różnic w częstości występowania AKI między pacjentami onkologicznymi a nieonkologicznymi.

W badaniu prospektywnym wartości filtracji kłębuszkowej rosły tuż po zabiegu w obu grupach, a normalizowały się po 3 tygodniach. Przez cały czas obserwacji eGFR u dzieci przeszczepianych ze wskazań onkologicznych był znacząco wyższy niż w grupie nieonkologicznej. Przed zabiegiem stężenia klasteryny, cystatyny C i KIM-1 w surowicy były znacząco wyższe u dzieci poddawanych alloHSCT w porównaniu do grupy kontrolnej, a po zabiegu rosły systematycznie przez cały czas obserwacji.

Przed transplantacją stężenia klasteryny i KIM-1 w moczu były podwyższone w stosunku do grupy kontrolnej, następnie rosły znacząco do 3. tygodnia po zabiegu i pozostawały podwyższone w 4. tygodniu obserwacji. Stężenie cystatyny C w moczu było podwyższone przed zabiegiem, ulegało dalszemu wzrostowi dopiero 2 tygodnie po zabiegu i nieznacznemu obniżeniu 4 tygodnie po alloHSCT. Nie wykazano istotnych różnic między stężeniami badanych parametrów w grupach pacjentów onkologicznych i nieonkologicznych.

Częstość występowania AKI u dzieci po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych jest niezależna od wskazań do transplantacji i rośnie z czasem, osiągając najwyższe wartości między 4. tygodniem a 3. miesiącem po zabiegu. Wysoki odsetek dzieci z wyjściową hiperfiltracją, ulegający dodatkowo zwiększeniu po alloHSCT, utrudnia adekwatną ocenę funkcji nerek zarówno przed zabiegiem, jak i we wczesnym okresie poprzyszczepowym. Wskaźnik filtracji kłębuszkowej okazał się jedynym markerem przydatnym w dywersyfikacji pacjentów onkologicznych i nieonkologicznych. Podwyższone w stosunku do grupy kontrolnej stężenia klasteryny, cystatyny C i KIM-1 w surowicy i moczu świadczą o subklinicznym uszkodzeniu nerek, obecnym u dzieci już przed alloHSCT i ulegającym nasileniu po zabiegu. Klasteryna w moczu może okazać się przydatnym markerem subklinicznego AKI, wyprzedzającym w czasie zmiany funkcji filtracyjnej nerek i umożliwiającym wczesne rozpoznanie dysfunkcji cewek nerkowych. Ocena funkcji nerek u dzieci poddawanych zabiegowi przeszczepienia komórek hematopoetycznych powinna obejmować analizę klasycznych parametrów filtracji kłębuszkowej, wzbogaconą o oznaczenia nowych markerów uszkodzenia.

12. Summary

Hematopoietic stem cell transplantation in children is often complicated by acute kidney injury. Assessment of renal function in everyday practice is usually restricted to serum creatinine values and creatinine-based estimation of glomerular filtration rate. However, serum creatinine concentration depends on hydration status or muscle mass and its elevation in response to damage appears relatively late. Moreover, estimation of AKI incidence relies on the precision of three available AKI classifications. Conditions under which HSCT is performed urge early diagnostics of AKI. Thus, search for new parameters of damage, anticipating serum creatinine rise and eGFR decrease, seems thoroughly justified.

The aim of this study was to analyze the impact of HSCT on kidney function in children, to assess the incidence of AKI in relation to various indications for the procedure (oncological versus nononcological), and to search for early markers, able to diagnose AKI before pRIFLE criteria are fulfilled. Retrospective analysis concentrated on the follow up of eGFR values in children undergoing alloHSCT, starting the day before the procedure, then continuing 24 hours, 1, 2, 3, 4, 8 weeks, 3 and 6 months after transplantation. Approved markers of kidney damage (KIM-1, cystatin C) were analyzed in a prospective way together with clusterin, a candidate parameter of tubular function, not tested in patients undergoing HSCT so far.

The data of 135 children undergoing allotransplantation in the Department of Bone Marrow Transplantation, Pediatric Oncology and Hematology in years 2016-2018 were analyzed retrospectively. 89 children have undergone alloHSCT due to oncological reasons, 46 patients following nononcological indications.

Prospective study concerned 27 children undergoing allotransplantation in the Department of Bone Marrow Transplantation, Pediatric Oncology and Hematology in 2019. 18 children with normal kidney function diagnosed for monosymptomatic nocturnal enuresis in the Department of Pediatric Nephrology served as controls.

eGFR was calculated in all patients, then AKI was diagnosed based on pRIFLE criteria. Additionally, prospective study was enriched with the assessment of serum and urine concentrations of clusterin, new potential damage marker, as well as approved parameters of kidney function, like KIM-1 or cystatin C.

Retrospective analysis of selected parameters started before allotransplantation and has lasted until the 6th month after the procedure. Concentrations of clusterin, KIM-1 and cystatin

C were analyzed prospectively before alloHSCT, 24 hours after transplantation and then on a weekly basis until the 4th week after the procedure.

Retrospective study revealed that hiperfiltration was a common finding even before transplantation and it affected oncological patients to a greater extent than the nononcological ones. All children demonstrated eGFR increase within first 24 hours following alloHSCT and return to pre-transplantation values within 1-2 weeks. Patients transplanted due to oncological reasons suffered from gradual eGFR decrease since the 4th week until the 6th month after alloHSCT.

During the 6-month observation AKI was diagnosed in 54% of children according to pRIFLE criteria. The highest incidence concerned the period between 4 weeks and 3 months. Except for a single observation after 8 weeks, there were no differences in AKI incidence between oncological and nononcological patients.

Prospective analysis revealed the rise of eGFR values just after alloHSCT in both oncological and nononcological patients, with subsequent normalization after 3 weeks. Throughout the whole observation period oncological children demonstrated higher values of eGFR than nononcological patients.

Serum concentrations of clusterin, cystatin C and KIM-1 were increased in transplanted children versus controls and kept rising systematically after the procedure.

Urine concentrations of clusterin and KIM-1 in transplanted children were higher than in controls already before transplantation. They rose significantly until the 3rd week and then remained stable until the 4th week. Cystatin C urine concentrations were high already before alloHSCT, further increased no sooner than after 2 weeks and slightly decreased in the 4th week after transplantation. None of these parameters could distinguish between oncological and nononcological patients.

AKI incidence in children after HSCT was independent of indications for transplantation and rose with time, gaining its maximal values between the 4th week and 3rd month of observation. High percentage of patients with initial hyperfiltration, increasing additionally after transplantation, affects adequate assessment of kidney function both before and after it. eGFR turned out the only marker useful in effective differentiation between oncological and nononcological patients. Increased serum and urine concentrations of clusterin, cystatin C and KIM-1 testify to subclinical kidney injury, present already before transplantation and aggravating after it. Clusterin in urine may prove its usefulness as a marker of subclinical AKI, anticipating eGFR change and enabling early diagnosis of tubular dysfunction. Complex

analysis of kidney function in children undergoing HSCT should contain evaluation of classical parameters of glomerular filtration, enhanced by new damage markers.

Markers of acute kidney injury in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation

Monika Augustynowicz^{1,A–D}, Agnieszka Bargenda-Lange^{1,B–D},
Krzysztof Kałwak^{2,A,E,F}, Danuta Zwolińska^{1,E,F}, Kinga Musiał^{1,A–F}

¹ Department of Pediatric Nephrology, Wrocław Medical University, Poland

² Department of Bone Marrow Transplantation, Oncology and Pediatric Hematology, Wrocław Medical University, Poland

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation;

D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Advances in Clinical and Experimental Medicine, ISSN 1899–5276 (print), ISSN 2451–2680 (online)

Adv Clin Exp Med. 2019;28(8):1111–1118

Address for correspondence

Kinga Musiał

E-mail: kinga_musial@hotmail.com

Funding sources

None declared

Conflict of interest

None declared

Received on October 29, 2018

Reviewed on November 25, 2018

Accepted on December 13, 2018

Published online on February 11, 2019

Abstract

Acute kidney injury (AKI), one of the major complications in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), is an independent predictor of the patient's survival and a prognostic factor of progression to chronic kidney disease (CKD). Despite the multifaceted role of AKI, its early diagnosis in the course of HSCT remains a challenge. These difficulties may result from the inefficiency of traditional methods used to assess kidney function, like serum creatinine or estimated glomerular filtration rate. Moreover, the list of potential AKI markers tested in HSCT conditions is limited and does not involve indexes evaluated in the pediatric population. This review summarizes current knowledge on the pathophysiology of AKI developing in the course of HSCT; presents well-known markers of AKI that are potentially applicable in children who have undergone HSCT; discusses the role of new markers in diagnosing AKI and predicting the renal outcome in children undergoing HSCT; and analyzes the prospects for the use of new tools for assessing kidney injury in everyday clinical practice.

Key words: chronic kidney disease, nephrotoxicity, acute tubular damage, renal outcome, hematopoietic stem cell transplantation

Cite as

Augustynowicz M, Bargenda-Lange A, Kałwak K, Zwolińska D, Musiał K. Markers of acute kidney injury in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Clin Exp Med.* 2019;28(8):1111–1118. doi:10.17219/acem/101573

DOI

10.17219/acem/101573

Copyright

© 2019 by Wrocław Medical University

This is an article distributed under the terms of the

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an area of medicine under constant development. In recent years, the number of allogeneic bone marrow transplantations has increased significantly. In addition to hemato-oncological diseases, the indications for HSCT include immunologic, metabolic and genetically determined conditions.

Current methods of assessing kidney function following hematopoietic stem cell transplantation

As HSCT has become more and more frequently the therapy of choice in children, the number of complications observed has increased. Among them, acute kidney injury (AKI) has become one of the major challenges, as it is an independent predictive factor for patient survival and progression to chronic kidney disease (CKD).^{1,2}

Although there are many reviews on HSCT, few of them concern the pediatric population,^{3–5} and none of them concentrate on the nephrological aspects of HSCT.

Moreover, the commonly used classifications of AKI comprise various criteria established by the Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage (RIFLE) renal failure classification system, the Acute Kidney Injury Network (AKIN) and the Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) organization.^{6–8} However, only pRIFLE criteria apply specifically to children (Table 1).

Due to the diversity of these classifications, world statistics on the incidence of AKI in children are very inconsistent. As shown in a study by Sutherland et al., the incidence of AKI in a single group of hospitalized children

varied significantly depending on the criteria used (51.1%, 37.1% and 40.3% according to pRIFLE, AKIN and KDIGO, respectively).⁹ The AKIN and KDIGO classifications rely on changes in serum creatinine concentration, while pRIFLE criteria are additionally based on decreases in the estimated glomerular filtration rate (eGFR) and urine output (Table 1). Moreover, the fact that the pRIFLE criteria take into account the time frame and diversification of the outcome (reversible injury vs progression to CKD) make them the most useful for children.

It is worth noting that in cases of kidney function deterioration, increases in serum creatinine concentration are significantly delayed. Furthermore, many factors, such as nutrition, hydration, gender, age, and muscle mass, influence the serum concentration of creatinine. Hydration status after HSCT varies depending on the time elapsed from the procedure. During the first few days after HSCT, the treatment protocol assumes a high fluid intake (3 L/m² of body surface), resulting in transient hyperfiltration. Moreover, the method of eGFR calculation raises certain doubts. The most commonly applied Schwartz formula overestimates eGFR value, especially when it is higher than 75 mL/min/1.73 m². However, attempts to introduce other methods have so far been unsatisfactory.^{10–12} As a consequence, evaluation based on serum creatinine concentration remains the most frequent tool to assess kidney function in children undergoing HSCT, despite its many limitations in terms of sensitivity and specificity for AKI. However, recent reports show preliminary attempts to widen the spectrum of AKI indices by testing markers of inflammation or damage specific to selected compounds of the renal parenchyma.

The purpose of this review was to briefly present current knowledge about the pathophysiology of AKI in the course

Table 1. Comparison of various criteria defining acute kidney injury

Pediatric (p)RIFLE	eGFR	Urine output
Risk (Stage 1)	decrease <25%	<0.5 mL/kg/h for 8 h
Injury (Stage 2)	decrease <50%	<0.5 mL/kg/h for 16 h
Failure (Stage 3)	decrease <75% or <35 mL/min/1.73 m ²	<0.3 mL/kg/h for 24 h or anuria for 12 h
Loss	failure >4 weeks	
End-stage kidney disease	persistent failure >3 months	
AKIN criteria	serum creatinine	
Stage 1	increase ≥50% or ≥0.3 mg/dL within 48 h	
Stage 2	increase ≥100%	
Stage 3	increase ≥200%	
KDIGO AKI criteria	serum creatinine	
Stage 1	increase ≥50% or ≥0.3 mg/dL within 7 days	
Stage 2	increase ≥100%	
Stage 3	increase ≥200% or ≥35 mL/min/1.73 m ²	

of pediatric HSCT and current diagnostic tools for its assessment. We also aimed to discuss new markers that may potentially be useful in the early diagnosis of HSCT-related AKI, although they are not yet used in clinical practice.

Reasons for acute kidney injury following hematopoietic stem cell transplantation

The first determinant of post-HSCT AKI is the type of HSCT itself. Myeloablative allogeneic HSCT is characterized by the highest incidence of AKI (50–91%), whereas nonmyeloablative allogeneic (29–54%) and autologous HSCT (12–52%) are less frequently involved in AKI.¹³

The pathogenesis of AKI following HSCT is complex and covers pre-renal, renal and post-renal mechanisms.¹⁴ Among them, renal causes are the most common, with ischemia and acute tubular necrosis due to drug nephrotoxicity playing the main role. The causes of renal impairment after HSCT also strongly depend on the amount of time since the transplantation, and can be divided into immediate (tumor lysis syndrome, marrow infusion toxicity), early (hypovolemia due to diarrhea, vomiting and sepsis, drug nephrotoxicity, acute tubular necrosis, interstitial nephritis, reactivation of viral infections resulting in hemorrhagic cystitis, graft vs host disease (GvHD), and hepatic sinusoidal obstruction syndrome (HSOS)) and late (thrombotic microangiopathy, chronic GvHD and radiation).¹³

Describing the whole spectrum of HSCT-related factors predisposing to AKI is beyond the scope of this review; we are therefore going to focus only on selected ones. Among them, GvHD seems to be the best example of the multifactorial nature of HSCT-related AKI.¹³

Graft vs host disease

In the course of GvHD, the kidneys become targets for T cells. During the first month after HSCT, the process of infiltration of the tubulointerstitial area occurs. Immunocompetent cell migration and cytokine-mediated inflammatory reaction in situ result in damage to the peritubular capillaries, tubules and glomeruli, and in thickening of the vascular intima.¹⁵ Paradoxically, the prophylactic regimen against GvHD, containing cyclosporine, tacrolimus or short-term methotrexate, may become another trigger factor for AKI. Moreover, the indirect propensity towards reactivation of viral infection that arises in the course of GvHD adds to the AKI-promoting background.¹⁵

Marrow transfusion toxicity

Cryopreservation of stem cells is a standard component of the clinical protocol in autologous HSCT, whereas it is rare in allogeneic HSCT. The collected cells are washed and resuspended in a solution supplemented with a cryoprotective agent, most typically dimethyl sulfoxide (DMSO). Dimethyl sulfoxide is considered the main causal agent of adverse reactions, such as lysis of erythrocytes, leading to precipitation of heme proteins in the proximal tubules and subsequent acute tubular necrosis.¹⁶

Hepatic sinusoidal obstruction syndrome

The pathophysiology of HSOS, present mainly in patients who have undergone myeloablative allogeneic HSCT, remains poorly defined. Total body irradiation and busulfan/cyclophosphamide preconditioning can cause damage to sinusoidal endothelial cells and hepatocytes.¹⁷ The subsequent subendothelial deposition of morphological blood compounds and fibrin results in hepatic venular narrowing and occlusion; portal hypertension then evolves. Consequently, the accumulation of vasodilators in the liver results in systemic hypotension. The compensative activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) triggers constriction of renal vessels and hypoperfusion.¹⁷

Infections

The use of immunosuppressive drugs may lead to reactivation of latent viral infections, affecting approx. 25% of patients who have undergone allogeneic HSCT.¹⁸ The majority of the population is seropositive to the BK virus – a member of the polyomavirus family with tropism to the urinary tract. The reactivation and massive replication of the BK virus lead to the formation of decoy cells (cells with large intranuclear inclusion bodies) programmed to die and release copied viral components, and are implicated in the pathogenesis of hemorrhagic cystitis and urethral stenosis. BK viruria may escalate to viremia and finally to the presence of the BK virus in the tubular epithelial cells of the kidney, and to kidney damage in the course of tubulointerstitial nephritis.

Another potent infectious condition in the course of HSCT is sepsis, triggering both pre-renal (hypovolemia due to inflammatory vasodilation) and renal (direct tubular damage due to cytokine release) circumstances facilitating the development of AKI.

Transplant-associated thrombotic microangiopathy

Transplant-associated thrombotic microangiopathy (TA-TMA) is in the spectrum of disorders characterized by vascular endothelial injury followed by arteriolar thrombi, intimal swelling and fibrinoid necrosis. Clinically, it is manifested by thrombocytopenia, hemolytic anemia and tissue hypoxia. Although TA-TMA may occur in any organ, the kidneys are affected in 40% of cases, and 20% of them undergo a severe course. The risk factors for TA-TMA include the use of pharmacotherapy with calcineurin inhibitors, acute GvHD, total body irradiation, patient-donor gender mismatch, and infections.¹⁹

Nephrotoxicity of chemotherapy

Potentially nephrotoxic drugs are used both during conditioning therapy (busulfan, treosulfan, fludarabine, thiotepa, melphalan, cyclophosphamide) and as GvHD prophylaxis (cyclosporin A, tacrolimus, methotrexate).²⁰ The pathomechanisms of nephrotoxicity for calcineurin inhibitors are not fully defined. Cyclosporin A and tacrolimus activate the RAAS, leading to vasoconstriction of the renal afferent arterioles and subsequent AKI. They also increase oxidative stress, acting directly on renal endothelial cells. Finally, through increased production of vascular endothelial growth factor (VEGF), they trigger peritubular fibrosis, which is responsible for chronic drug-induced nephropathy. Methotrexate (MTX), especially in high doses, precipitates in acidic pH in the lumen of the renal tubules, leading to tubular toxicity.²⁰ Male sex, low serum albumin levels, previous kidney pathologies, and interactions with other drugs (including furosemide) may intensify the nephrotoxicity of MTX.

The mechanism of the toxicity of cisplatin is attributed to its accumulation in the kidney, mainly in the epithelial cells of the proximal tubules, leading to their dysfunction.²⁰ The epithelium of the distal tubules and glomeruli are subsequently affected. Cyclophosphamide has a high affinity to urothelium, so hemorrhagic cystitis is a major clinical manifestation of its usage. However, it also acts detrimentally on the renal tubules by inducing oxidative stress. Isophosphamide is characterized by tropism to the epithelium of the proximal tubules, causing AKI.

Drugs used in the prophylaxis or treatment of infections, such as aminoglycosides, amphotericin B or acyclovir, are well known for their nephrotoxic mechanisms. Amphotericin B acts through renal vasoconstriction and hypoxia of the proximal tubule cells; aminoglycosides accumulate directly in the proximal tubules, changing their permeability; whereas acyclovir precipitates in the tubules, causing their obstruction.²⁰

Markers of acute kidney injury

The high incidence of AKI in the course of HSCT has engendered a search for sensitive and specific markers of kidney damage. Although serum creatinine-based equations remain the major tool for assessing kidney function by eGFR, there is need for more adequate parameters that would allow early diagnosis of AKI, preferably at the stage when it is still reversible. Since the proximal tubule is the first target cell in AKI-triggered renal damage, the research should focus mainly on markers that directly characterize its function.

Parameters of tubular damage

Cystatin C

Cystatin C (CysC) is a low molecular weight (13 kDa) non-glycosylated protein generated by all nucleated cells, present in all tissues and physiological fluids. CysC can be assessed by ELISA in both serum and urine. Serum CysC outperforms serum creatinine in assessing eGFR in children.²¹ Increases in serum CysC have been shown to correlate with the development of AKI in children from intensive care units and following cardiac surgery, as well as in adults following HSCT.²² However, it has also been helpful in analyzing glomerular damage due to chemotherapy in children.²³ Moreover, increased serum CysC concentrations have been observed in patients with leukemia, melanoma, as well as colorectal or hepatocellular cancer, but without renal injury. Therefore, high serum CysC is not specific for AKI, because it may well be a marker of malignancy.²⁴

On the other hand, CysC is filtered by glomeruli, then reabsorbed and degraded in the proximal tubules. It is not secreted by the tubules, so its urinary concentration is minimal in subjects with normal kidney function, but increases significantly in the course of kidney injury.²⁵ Therefore, urinary CysC may be a potential early marker of proximal tubule damage in the course of post-HSCT AKI, but no data are available.

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is another low-molecular-weight protein (25 kDa), originally identified in secondary granules of human neutrophils and as such, is released into circulation from organs like the liver, lungs, trachea, colon, uterus, or prostate. It is filtered by the glomeruli and reabsorbed by the proximal tubules.²⁶

Serum NGAL acts in a bacteriostatic manner by binding siderophores – bacterial products that scavenge iron. Kidney-derived NGAL accompanies the differentiation and development of the tubular epithelium and is one of the earliest markers of distal nephron damage.²⁶

Both serum and urine NGAL are useful predictors of AKI, although its urinary concentration is more sensitive for kidney injury.²⁷ NGAL is widely used for early diagnosis of AKI, its monitoring and prognosis. It has also become useful in pediatric AKI, mainly in its early diagnosis after cardiac surgery and as a predictor of mortality.

However, NGAL is also overexpressed in other conditions, such as tumors or inflammatory bowel disease.²⁸ It is used to monitor the nephrotoxicity of drugs like iphosphamide, cisplatin and cyclosporine.²⁹ Increased plasma NGAL reflects inflammation, including sepsis, whereas urinary NGAL points rather to urinary tract infection.³⁰ NGAL may also suppress metastatic processes.²⁸

The role of urinary NGAL in predicting AKI has been demonstrated in adults who have undergone HSCT for oncological reasons: as markers of AKI, elevated urinary NGAL preceded increased serum creatinine by 2 days.³¹ No such investigation has been performed in children who have undergone HSCT.

Kidney injury molecule 1

Kidney injury molecule 1 (KIM-1) is a glycoprotein, the localization of which is limited to the apical membranes of the proximal tubules. Physiological urinary KIM-1 concentration is negligible, whereas it increases after ischemic or nephrotoxic AKI. Renal biopsies performed after acute tubular necrosis revealed increased expression of KIM-1 in proximal tubule cells.³² This molecule is also a scavenger receptor of paramount importance for apoptosis and regeneration of damaged epithelial cells in the proximal tubules. Urinary KIM-1 has been shown to be useful in the detection of neoplasms originating in the proximal tubules, ovaries or uterus (clear cell cancer).²⁸

Increases in urinary KIM-1 have been found to correlate with AKI due to acute tubular necrosis.³³ In children, KIM-1 has been shown to be a useful marker for AKI following shock-related hypovolemia – more sensitive and specific than serum creatinine, NGAL or interleukin-18 (IL-18). However, the correlation with the severity of AKI in children from an intensive care unit was quite weak, although KIM-1 could strongly predict the need for renal replacement therapy.³⁴ Kidney injury molecule 1 is also a useful marker of kidney function in children undergoing chemotherapy with MTX or cisplatin derivatives.³⁵ Although the value of KIM-1 as a marker for AKI has been demonstrated in a recent meta-analysis³⁶, none of the data concerned the detection of AKI following HSCT.

N-acetyl-beta-D-glucosaminidase

N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) is a lysosomal enzyme of high molecular weight, found originally in proximal tubule cells, released after their damage and therefore considered a marker of their dysfunction. The urinary concentration of NAG increases in AKI, as has been shown

in adult patients that have undergone cardiac surgery.³⁷ Like KIM-1, NAG is a strong predictor of a poor prognosis in adults with AKI.³⁸

Preliminary reports from animal studies suggest that NAG may be useful in assessing AKI in the course of acute GvHD following allogeneic HSCT.³⁹ Urinary NAG could detect tubular damage at the subclinical level and hepatic veno-occlusive disease, although it did not correlate with the level of azotemia in patients who had undergone allogeneic HSCT.⁴⁰ Elevated urinary NAG has also been reported in subjects with acute tubular necrosis not related to HSCT. There are 2 recent studies on increased NAG concentration in the urine of adults and children who have undergone HSCT.^{41,42} These results are promising, because urinary NAG seems to be an ideal marker of early tubular damage, preceding the development of AKI.

Inflammatory markers

Interleukin-18

Interleukin 18 is a pro-inflammatory cytokine, released by monocytes/macrophages, activated by caspase-1 and inducing interferon gamma. Widespread, IL-18 is also present in various kidney structures, like distal tubules, collecting ducts and the ascending limb of the loop of Henle. However, it is not found in proximal tubules or glomeruli. Increased serum IL-18 concentrations are typical of many inflammation-related diseases, including autoimmune disorders like lupus, arthritis, inflammatory bowel disease, psoriasis, hepatitis, diabetes, or sclerosis multiplex.⁴³ This multiplicity suggests the weak specificity of this marker.

Animal studies have shown elevated urinary concentration of IL-18 in AKI following ureteral obstruction.⁴⁴ Due to its pro-inflammatory activity, IL-18 seems to aggravate kidney damage in the course of ischemia/reperfusion injury; patients with acute tubular necrosis presented with higher urinary IL-18 than those with CKD, urinary tract infection, nephrotic syndrome, or pre-renal azotemia.⁴⁵ Urinary IL-18 (like NGAL) has been found to be a strong predictor of AKI in children who had undergone cardiac surgery, since the diagnosis was made 12 h earlier than with serum creatinine.⁴⁶ The prognostic value of IL-18 in diagnosing AKI, the need for renal replacement therapy and 90-day mortality was demonstrated in a large cohort of adults in an intensive care unit.⁴⁷ However, there is still a need for thorough investigation of the applicability of IL-18 to detect AKI following HSCT in children.

Monocyte chemoattractant protein 1

Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 is one of the key chemokines regulating the migration and infiltration of monocytes/macrophages to the sites of inflammation.

It is also a pathogenic factor in many diseases, including AKI. Rice et al. noted an elevated urinary concentration of MCP-1 in mice at 24 and 72 h after renal ischemia.⁴⁸ In another study, increased expression of MCP-1 in the renal cortex of mice with AKI correlated with the level of kidney damage better than NGAL.⁴⁹ Urinary MCP-1 has been found to correlate strongly with the level of AKI in patients treated with cisplatin or tacrolimus, as well as with serum creatinine increase in adults 5 weeks after HSCT; it also predicted mortality risk after cardiac surgery.⁵⁰ A significant elevation of MCP-1 concentration in children undergoing HSCT has been observed between the 2nd and 4th week after the procedure, but it was not correlated with AKI.⁵¹

New acute kidney injury indexes

Liver-type fatty acid-binding protein

Liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP) is produced mainly in the liver, but its expression is also noticeable in other organs, including the kidneys. It takes part in the transport and metabolism of free fatty acids, acting as an anti-oxidant. In the proximal tubules, it allows intracellular metabolism of fatty acids. It is filtered by the glomeruli and reabsorbed by the proximal tubules.⁵² It is not present in the urine of healthy subjects, but has been found to be an early predictor of AKI due to sepsis or drug nephrotoxicity.^{53,54} Increased urinary concentrations of L-FABP have also been described in adults with acute decompensated heart failure or surgically treated aortic aneurysm.^{55,56} To date, a single promising report has been published on urinary L-FABP as a marker of AKI risk in adult patients following HSCT.⁵⁷

Insulin-like growth factor-binding protein 7

Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7 is another low-molecular-weight protein (30 kDa) freely filtered by the glomeruli and reabsorbed by the proximal tubules; its increased urinary concentration is most probably the consequence of tubular damage.⁵⁸ Indeed, increased urinary IGFBP-7 concentrations have been noticed in patients from intensive care units. They could also predict the renal outcome, distinguishing between patients with and without AKI, or between those with early recovery from AKI and late or non-recovery.⁵⁹ Moreover, IGFBP-7 has been found to be a more useful tool than NGAL in the differential diagnosis and prognosis of AKI. Thus, IGFBP-7 seems another ideal candidate as a diagnostic and prognostic marker of AKI. However, no data is available on investigations of urinary IGFBP-7 concentrations in patients who have undergone HSCT, irrespective of their age.

Netrin-1

Netrin-1 is a 70 kDa axon guidance molecule with an anti-inflammatory activity, expressed in many organs, including the kidneys. In vitro investigations have demonstrated its paramount role in ischemia/reperfusion kidney injury, during which the expression of netrin-1 increased in the apical membranes of proximal tubule cells, acting in a protective manner. Its anti-inflammatory and anti-apoptotic activity has also been found to be highly efficient against cisplatin-induced kidney injury.⁶⁰ Moreover, urinary netrin-1 has been reported to be an early predictor of AKI following cardiac surgery.⁶¹ However, no evidence for its role as a biomarker of HSCT-related AKI has been presented to date.

Markers of acute kidney injury progression to chronic kidney disease

Although potentially reversible, in some cases AKI progresses into CKD. Long-term unfavorable outcomes for children with AKI are defined in the pRIFLE criteria as loss of kidney function (L) and end-stage kidney disease (E). The major nephrological challenge is therefore to identify patients at risk of developing CKD after an episode of AKI. Candidate markers for assessing AKI-to-CKD progression include NGAL, KIM-1 and L-FABP, although convincing data on their utility in long-term observation of children who have undergone HSCT are lacking.⁶² Another promising biomarker is clusterin, identified in animal studies as a factor responsible for anti-inflammatory and anti-fibrotic activity after ischemia/reperfusion injury.⁶³ However, tools for predicting AKI-to-CKD progression following HSCT are yet to be established.

Targeted, pleiotropic or combined?

Post-HSCT AKI has a multifactorial background, and as such should be assessed in a complex way. Many questions about the quantity and quality of markers used to evaluate AKI in these conditions remain unanswered. Can we rely on single markers specific for (e.g.) tubular damage, inflammation or drug side effects, or should we search for markers with pleiotropic functions, designating (e.g.) both tissue damage and nephrotoxicity? Is urine the only milieu that adequately shows AKI-related anomalies or should we implement serum markers as additional predictors? Is the early diagnosis of AKI our major goal or should we strive for both protectors of kidney function and predictors of renal outcomes? These questions also remain unanswered in the general field of AKI. However,

some attempts have been made to establish new paradigms of AKI diagnosis, tailored to various pathologies responsible for kidney injury. Parikh and Mansour have suggested combinations of new urinary markers helpful in distinguishing between acute tubular necrosis and reversible prerenal azotemia due to hypoxia (IL-18, NGAL, KIM-1), or between the aforementioned conditions and hepatorenal syndrome (NGAL, L-FABP, IL-18).⁶⁴ Another interesting option is the concomitant evaluation of markers in pairs, as in the case of association of [TIMP-2] × [IGFBP-7] in the urine of critically ill adults, where it has identified AKI patients at increased risk of mortality.⁶⁵ These examples represent a promising direction, but more studies are needed to establish guidelines applicable in everyday practice, including guidelines for patients undergoing HSCT.

Clinical perspective

No guidelines for the early detection of AKI in children undergoing HSCT exist. Preliminary data suggest the usefulness of urinary NGAL and L-FABP in adults following HSCT, and urinary NAG has been positively tested in children following HSCT. However, the use of a marker in pediatric clinical practice demands easily available material and accessible age-related reference values. Currently, the data on the latter involve established markers of AKI, such as urinary IL-18, KIM-1, L-FABP, and NGAL.⁶⁶ Fortunately, this combination additionally covers differential diagnostics, essential in cases of HSCT-related AKI, between pre-renal azotemia, acute tubular necrosis and liver-based causes of AKI. Moreover, KIM-1, L-FABP and NGAL may predict AKI-to-CKD progression. Therefore, this quartet appears to be the most promising and should be recommended first for clinical testing in children who have undergone HSCT.

Conclusions

Acute kidney injury is becoming a serious clinical challenge in the era of widespread HSCT availability. The panel of candidate AKI markers is wide, although the majority of them have not yet been tested in post-HSCT conditions. It is clear that the analysis of diagnostic and prognostic tools for AKI in children who have undergone HSCT should take into account the multifactorial nature of the process, including hypoxia, drug toxicity and immune-mediated reactions in the course of GvHD. Although none of the AKI biomarkers discussed in this review is used in everyday clinical practice, urinary IL-18, KIM-1, L-FABP, and NGAL seem like promising candidates to be tested in the pediatric population undergoing HSCT. From a clinical point of view, a reliable panel of AKI markers is an emerging necessity, if the therapy introduced today is to be effective tomorrow.

References

- Kizilbash SJ, Kashtan CE, Chavers BM, Cao Q, Smith AR. Acute kidney injury and the risk of mortality in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(7):1264–1270.
- Ileri T, Ertem M, Ozcakar ZB, et al. Prospective evaluation of acute and chronic renal function in children following matched related donor hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant.* 2010;14(1):138–144.
- Didsbury MS, Mackie FE, Kennedy SE. A systematic review of acute kidney injury in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant.* 2015;19(5):460–470.
- Raina R, Herrera N, Krishnappa V, et al. Hematopoietic stem cell transplantation and acute kidney injury in children: A comprehensive review. *Pediatr Transplant.* 2017;21(4):e12935.
- Koh K-N, Sunkara A, Kang G, et al. Acute kidney injury in pediatric patients receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation: Incidence, risk factors, and outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;24(4):758–764.
- Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute Dialysis Quality Initiative workgroup: Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care.* 2004; 8(4):R204–R212.
- Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al; Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care.* 2007;11(2):R31.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl.* 2012;2:1–138.
- Sutherland SM, Byrnes JJ, Kothari M, et al. AKI in hospitalized children: Comparing the pRIFLE, AKIN, and KDIGO definitions. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(4):554–561.
- Holmes J, Roberts G, May K, et al. The incidence of pediatric acute kidney injury is increased when identified by a change in a creatinine-based electronic alert. *Kidney Int.* 2017;92(2):432–439.
- Laskin BL, Nehus E, Goebel J, Furth S, Davies SM, Jodele S. Estimated versus measured glomerular filtration rate in children before hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20(12):2056–2061.
- Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(3): 629–637.
- Kemmner S, Verbeek M, Heemann U. Renal dysfunction following bone marrow transplantation. *J Nephrol.* 2017;30(2):201–209.
- Lopes J, Jorge S, Neves M. Acute kidney injury in HCT: An update. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:755–762.
- Motoyoshi Y, Endo A, Takagi M, et al. Graft versus host disease-dependent renal dysfunction after hematopoietic stem cell transplantation. *CEN Case Rep.* 2014;3(2):202–205.
- Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: Adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49:469–476.
- Fan CQ, Crawford JM. Sinusoidal obstruction syndrome (hepatic veno-occlusive disease). *J Clin Exp Hepatol.* 2014;4(4):332–346.
- Abudayyeh A, Hamdi A, Lin H, et al. Symptomatic BK virus infection is associated with kidney function decline and poor overall survival in allogeneic hematopoietic stem cell recipients HHS Public Access. *Am J Transplant.* 2016;16(5):1492–1502.
- Rosenthal J. Hematopoietic cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy: A review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Blood Med.* 2016;7:181–186.
- Perazella MA. Onco-nephrology: Renal toxicities of chemotherapeutic agents. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(10):1713–1721.
- Nakhjavan-Shahraki B, Yousefifard M, Ataei N, et al. Accuracy of cystatin C in prediction of acute kidney injury in children; serum or urine levels: Which one works better? A systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol.* 2017;18(1):120.
- Volpon LC, Sugo EK, Carlotti APCP. Diagnostic and prognostic value of serum cystatin C in critically ill children with acute kidney injury. *Pediatr Crit Care Med.* 2015;16(5):e125–131.

23. Kos J, Lah TT. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: Target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep.* 1998;5(6):1349–1361.
24. Lah TT, Kos J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem.* 1998;379:125–130.
25. Muto H, Ohashi K, Ando M, Akiyama H, Sakamaki H. Cystatin C level as a marker of renal function in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2010;91(3):471–477.
26. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(2):407–413.
27. Abdulaziz Kari J, Ahmed Shalaby M, Sofyani K, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and serum cystatin C measurements for early diagnosis of acute kidney injury in children admitted to PICU. *World J Pediatr.* 2018;14(2):134–142.
28. Marchewka Z, Tacik A, Piwowar A. KIM-1 and NGAL as potential biomarkers for the diagnosis and cancer progression. *Postepy Hig Med Dosw.* 2016;70:329–336.
29. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Taranta-Janusz K, Michaluk-Skutnik J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatr Nephrol.* 2010;25(5):889–897.
30. Soni SS, Cruz D, Bobek I, et al. NGAL: A biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int Urol Nephrol.* 2010;42(1):141–150.
31. Taghizadeh-Ghehi M, Sarayani A, Ashouri A, Ataei S, Moslehi A, Hadjibabaie M. Urine neutrophil gelatinase associated lipocalin as an early marker of acute kidney injury in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Ren Fail.* 2015;37(6):994–998.
32. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62:237–244.
33. Huang Y, Don-Wauchope AC. The clinical utility of kidney injury molecule-1 in the prediction, diagnosis and prognosis of acute kidney injury: A systematic review. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2011;10(4):260–271.
34. Westhoff JH, Seibert FS, Waldherr S, et al. Urinary calprotectin, kidney injury molecule-1, and neutrophil gelatinase-associated lipocalin for the prediction of adverse outcome in pediatric acute kidney injury. *Eur J Pediatr.* 2017;176(6):745–755.
35. Carvalho Pedrosa D, Macedo De Oliveira Neves F, Meneses GC, et al. Urinary KIM-1 in children undergoing nephrotoxic antineoplastic treatment: A prospective cohort study. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(12):2207–2213.
36. Shao X, Tian L, Xu W, et al. Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: A meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(1):e84131.
37. Lannemyr L, Lundin E, Reinsfelt B, et al. Renal tubular injury during cardiopulmonary bypass as assessed by urinary release of N-acetyl- β -D-glucosaminidase. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2017;61(9):1075–1083.
38. Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, et al. Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(3):904–912.
39. Koyner JL, Shaw AD, Chawla LS, et al. Tissue inhibitor metalloproteinase-2 (TIMP-2) and IGF-binding protein-7 (IGFBP7) levels are associated with adverse long-term outcomes in patients with AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(7):1747–1754.
40. Fink J, Cooper M, Burkhart K, McDonald G, Zager Fink RJ, McDonald GB, Zager RA. Marked enzymuria after bone marrow transplantation: A correlate of veno-occlusive disease-induced hepatorenal syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 1995;6(6):1655–1656.
41. Volkan Hazar MD, Ozgul Gungor MD, Ayfer Gur Guven MD, et al. Renal function after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53(2):97–202.
42. Morito T, Ando M, Tsuchiya K, Nitta K. Early identification of acute kidney injury after hematopoietic stem cell transplantation by the measurement of urinary biomarkers [in Japanese]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi.* 2011;53(8):1150–1158.
43. Urbschat A, Obermüller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers.* 2011;16(Suppl 1):22–30.
44. Franke EI, Vanderbrink BA, Hile KL, et al. Renal IL-18 production is macrophage independent during obstructive injury. *PLoS One.* 2012;7(10):e47417.
45. Wu H, Craft ML, Wang P, et al. IL-18 contributes to renal damage after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(12):2331–2341.
46. Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, et al. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int.* 2006;70(1):199–203.
47. Nisula S, Yang R, Poukkanen M, et al. Predictive value of urine interleukin-18 in the evolution and outcome of acute kidney injury in critically ill adult patients. *Br J Anaesth.* 2015;114(3):460–468.
48. Rice JC, Spence JS, Yetman DL, Safirstein RL. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney. *Ren Fail.* 2002;24(6):703–723.
49. Munshi R, Johnson A, Siew ED, et al. MCP-1 gene activation marks acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(1):165–175.
50. Moledina DG, Isguven S, McArthur E, et al. Plasma monocyte chemoattractant protein-1 is associated with acute kidney injury and death after cardiac operations. *Ann Thorac Surg.* 2017;104(2):613–620.
51. Dicarlo J, Agarwal-Hashmi R, Shah A, et al. Cytokine and chemokine patterns across 100 days after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2014;20(3):361–369.
52. Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. *J Appl Genet.* 2006;47(1):39–48.
53. Doi K, Noiri E, Maeda-Mamiya R, et al. Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new biomarker of sepsis complicated with acute kidney injury. *Crit Care Med.* 2010;38(10):2037–2042.
54. Negishi K, Noiri E, Sugaya T, et al. A role of liver fatty acid-binding protein in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 2007;72(3):348–358.
55. Hishikari K, Hikita H, Nakamura S, et al. Urinary liver-type fatty acid-binding protein level as a predictive biomarker of acute kidney injury in patients with acute decompensated heart failure. *Cardiorenal Med.* 2017;7(4):267–275.
56. Obata Y, Kamijo-Ikemori A, Ichikawa D, et al. Clinical usefulness of urinary liver-type fatty-acid-binding protein as a perioperative marker of acute kidney injury in patients undergoing endovascular or open-abdominal aortic aneurysm repair. *J Anesth.* 2016;30(1):89–99.
57. Shingai N, Morito T, Najima Y, et al. Urinary liver-type fatty acid-binding protein linked with increased risk of acute kidney injury after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(12):2010–2014.
58. Emler DR, Pastor-Soler N, Marciszyn A, et al. Insulin-like growth factor binding protein 7 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2: Differential expression and secretion in human kidney tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(2):F284–F296.
59. Aregger F, Uehlinger DE, Witowski J, et al. Identification of IGFBP-7 by urinary proteomics as a novel prognostic marker in early acute kidney injury. *Kidney Int.* 2014;85(4):909–919.
60. Rajasundari A, Pays L, Mehlen P, Ramesh G. Netrin-1 overexpression in kidney proximal tubular epithelium ameliorates cisplatin nephrotoxicity. *Lab Invest.* 2011;91(12):1717–1726.
61. Ramesh G, Krawczeski CD, Woo JG, Wang Y, Devarajan P. Urinary netrin-1 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(3):395–401.
62. Goldstein SL, Devarajan P. Acute kidney injury in childhood: Should we be worried about progression to CKD? *Pediatr Nephrol.* 2011;26(4):509–522.
63. Guo J, Guan Q, Liu X, et al. Relationship of clusterin with renal inflammation and fibrosis after the recovery phase of ischemia-reperfusion injury. *BMC Nephrol.* 2016;17(1):133.
64. Parikh CR, Mansour SG. Perspective on clinical application of biomarkers in AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(6):1677–1685.
65. Koyner JL, Coca SG, Thiessen-Philbrook H, et al. Urine biomarkers and perioperative acute kidney injury: The impact of preoperative estimated GFR. *Am J Kidney Dis.* 2015;66(6):1006–1014.
66. Bennett MR, Nehus E, Haffner Ch, Ma Q, Devarajan P. Pediatric reference ranges for acute kidney injury biomarkers. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(4):677–685.

The incidence of acute kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A pilot study

Monika Augustynowicz^{1,A–D}, Krzysztof Kałwak^{2,A,B}, Danuta Zwolińska^{1,A,E,F}, Kinga Musiał^{1,A,C,D,F}

¹ Department of Pediatric Nephrology, Wrocław Medical University, Poland

² Department of Bone Marrow Transplantation, Pediatric Oncology and Hematology, Wrocław Medical University, Poland

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Advances in Clinical and Experimental Medicine, ISSN 1899–5276 (print), ISSN 2451–2680 (online)

Adv Clin Exp Med. 2021;30(1):87–92

Address for correspondence

Kinga Musiał
E-mail: kinga_musial@hotmail.com

Funding sources

None declared

Conflict of interest

None declared

Received on September 4, 2020
Reviewed on September 26, 2020
Accepted on November 11, 2020

Published online on January 30, 2021

Abstract

Background. Acute kidney injury (AKI) is a common feature in adults undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). However, accurate assessment of AKI incidence in the pediatric population still seems a challenge.

Objectives. To evaluate the incidence of AKI according to the pRIFLE criteria in children undergoing alloHSCT, with special focus on differences between patients transplanted due to oncological and non-oncological indications.

Material and methods. A retrospective analysis of data, concerning 135 children undergoing alloHSCT due to oncological (89 patients) or other (46 patients) reasons, was performed. The values of estimated glomerular filtration rate (eGFR) were measured before alloHSCT, 24 h after, 1, 2, 3, 4, 8 weeks, 3 and 6 months after alloHSCT, and the AKI incidence was analyzed.

Results. Acute kidney injury was diagnosed in 54% of all patients. The Risk stage (R) was noticed at least once in 46% of oncological and 37% of non-oncological children. The Injury stage (I) concerned 12% of oncological and 6% of non-oncological patients undergoing alloHSCT. The incidence of AKI in both groups was comparable. The mean eGFR values in oncological children were higher than those in the non-oncological patients even before transplantation and until the 4th week after alloHSCT. The eGFR increased significantly in all patients 24 h after alloHSCT and returned to pre-transplantation records after 2–3 weeks. Then, oncological patients demonstrated a gradual decrement of eGFR. Six months after transplantation, eGFR values in oncological children were significantly lower compared to pre-transplantation records, whereas in non-oncological children, these values were comparable.

Conclusions. Although the type of indication for alloHSCT has no impact on the AKI incidence, children undergoing alloHSCT due to oncological reasons are at greater risk of renal impairment 6 months after transplantation than non-oncological patients.

Key words: acute kidney injury, estimated glomerular filtration rate, hyperfiltration, pRIFLE criteria

Cite as

Augustynowicz M, Kałwak K, Zwolińska D, Musiał K.
The incidence of acute kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A pilot study. *Adv Clin Exp Med.* 2021;30(1):87–92.
doi:10.17219/acem/130355

DOI

10.17219/acem/130355

Copyright

© 2021 by Wrocław Medical University
This is an article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

Introduction

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a recognized treatment method in children, and the indications for it are being constantly expanded.^{1–4} The pediatric population undergoing HSCT is unique in that a substantial number of patients require transplantation as a therapeutic tool against inborn anomalies. Thus, apart from dominating oncological reasons, there is a growing number of non-oncological indications for HSCT in children, such as aplastic anemia, immunodeficiencies or metabolic diseases.^{1,3} Aggressive therapy is associated with the occurrence of numerous side effects and the development of life-threatening complications.^{5–8} In the early post-transplantation period, management of opportunistic infections and symptoms associated with graft-versus-host disease (GVHD) constitute the main issue. Moreover, the majority of the transplantation-related conditions, including GVHD, hypertension, sepsis, or drug nephrotoxicity, compose the list of risk factors for acute kidney injury (AKI).⁹

In the light of these findings, AKI in pediatric patients undergoing HSCT seems to be an underestimated problem. Multicenter analyses, concerning all children hospitalized due to AKI, have shown that HSCT patients constitute the most numerous group among them.¹⁰ World reports also show alarming data on up to 34% of HSCT patients in whom AKI turns into chronic kidney disease.^{11,12}

So far, there have been few publications attempting to assess the scale of kidney damage in children undergoing hematopoietic stem cell allotransplantation (alloHSCT).^{13,14} A systematic review, performed in Australia, has reported the incidence of AKI in children after HSCT as between 11% and 42%, based on changes in absolute serum creatinine values or decrease in diuresis.¹⁵ American data indicate a significantly higher incidence of AKI (up to 84%), based on the pediatric (p)RIFLE criteria defining subsequent stages of acute kidney injury (Risk, Injury, Failure, Loss of function, End stage kidney disease).¹⁶ The latter seem to be a more suitable way of AKI evaluation in children, because they take into account the eGFR variability instead of serum creatinine absolute values, which strongly depend on muscle mass and hydration status.¹⁷

However, none of these reports took into account the pediatric specificity of patients qualified for HSCT, nor compared the subpopulations of patients transplanted due to oncological and non-oncological reasons.

Objectives

Therefore, the objective of the study was to assess the AKI incidence based on the pRIFLE criteria in children undergoing alloHSCT in the early, intermediate and late post-transplantation period, with distinction between children transplanted because of oncological and non-oncological reasons.

Material and methods

A retrospective analysis concerned medical records of 178 patients undergoing first (173 children) or next (5 patients) alloHSCT in the Department of Bone Marrow Transplantation, Pediatric Oncology and Hematology (Wroclaw Medical University, Poland) in the years 2016–2018. The observation period started before introducing conditioning therapy, then control examinations were performed in the early (after 24 h, and then after 1, 2, 3 and 4 weeks), intermediate (after 8 weeks and 3 months) and late (after 6 months) post-transplantation period.

The exclusion criteria for the patients were the age below 2 years and over 18 years. The patients' age varied from 1.5 months to 26 years. One hundred thirty-five out of 178 children (78 boys and 57 girls) met the age criteria (mean age: 8.27 ±5.14 years). They were divided into 2 groups according to the indications for allotransplantation: oncological or other.

The 1st group consisted 89 patients (53 boys, 36 girls; mean age: 9.84 ±4.34 years) qualified for transplantation due to oncological reasons. The detailed indications are given in Fig. 1. Forty-five percent of these patients were classified as a high-risk group according to specific treatment protocols, while 22% experienced recurrence. A total of 17% of children underwent alloHSCT as a standard intervention, consistent with the primary disease protocol; the rest underwent transplantation due to the failure of previous therapy. In 71% of cases, the donor was unrelated, in 23% – related and in 6% – haploidentical.

The 2nd group included 46 patients (25 boys, 21 girls; mean age: 9.16 ±4.78 years) who underwent alloHSCT following non-oncological indications, listed in detail in Fig. 2. A total of 72% of children underwent alloHSCT from an unrelated donor, 24% from a related donor and 4% from a haploidentical donor.

The serum creatinine concentrations were assessed in the fixed time points according to the hematological

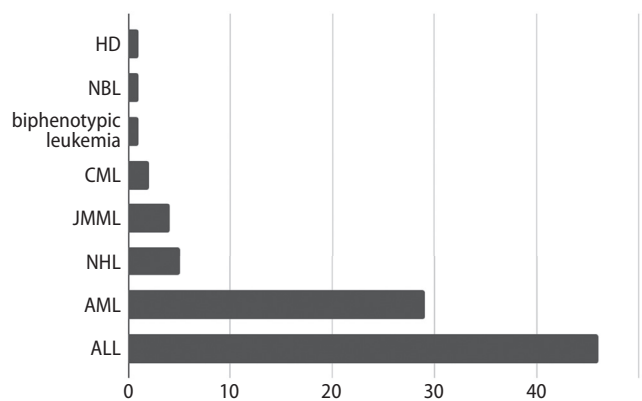


Fig. 1. Quantity of patients with oncological indications for alloHSCT

HD – Hodgkin disease; NBL – neuroblastoma, CML – chronic myeloid leukemia; JMML – juvenile myelomonocytic leukemia; NHL – non-Hodgkin disease; AML – acute myeloblastic leukemia; ALL – acute lymphoblastic leukemia.

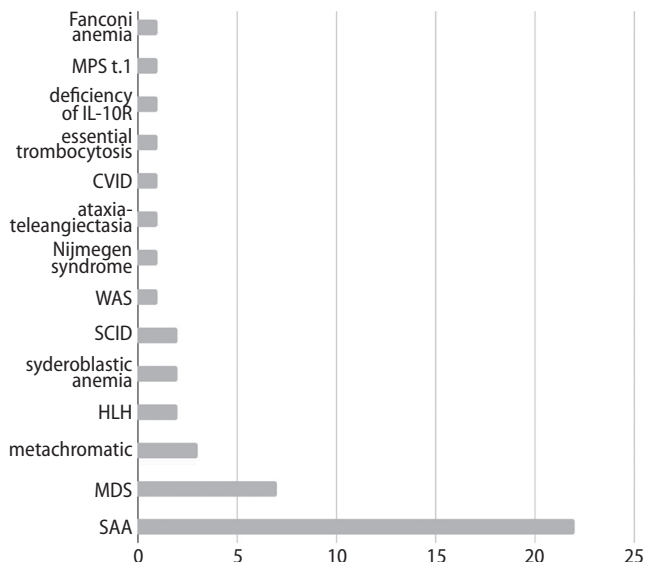


Fig. 2. Quantity of patients with non-oncological indications for alloHSCT

MPS t. 1 – mucopolysaccharidosis type 1; CVID – common variable immunodeficiency; WAS – Wiskott–Aldrich syndrome; SCID – severe variable immunodeficiency; HLH – hemophagocytic lymphohistiocytosis; MDS – myelodysplastic syndrome; SAA – severe aplastic anemia.

protocols: before conditioning, 24 h after allotransplantation, and then 1 week, 2, 3, 4, 8 weeks, and 3 and 6 months after alloHSCT. The creatinine concentration was measured using modified Jaffé method and eGFR was calculated based on the Schwarz formula.¹⁸ The eGFR changes were confronted with the pre-transplantation values.

In the majority of patients, conditioning therapy was myeloablative (busulfan, cyclophosphamide and fludarabine or fludarabine, treosulfan, thiotepa); the minority followed the non-myeloablative (cyclophosphamide, fludarabine) regimen. The protocol of prophylaxis against GVHD contained pre-HSCT ATG, cyclosporine A from 1 day before HSCT and methotrexate given in the 1st, 3rd and 6th day after transplantation. Ninety-eight out of 135 (69% of oncological and 77% of non-oncological) patients developed GVHD.

Acute kidney injury was diagnosed based on the pRIFLE criteria.¹⁷ Hyperfiltration was defined according to recent pediatric guidelines and meta-analysis as eGFR ≥ 140 mL/min/1.73 m².^{19,20}

Continuous variables were reported as mean \pm standard deviation (SD), and categorical variables as frequencies and percentages. The comparisons of continuous variables were performed with analysis of variance (ANOVA) and Student’s t-test. The relations between categorical variables were tested with χ^2 test or Fisher’s exact test. A value of $p < 0.05$ was considered significant. All calculations were carried out with the use of STATISTICA v. 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

All procedures were performed in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and its further amendments. The retrospective waiver of consent was obtained from the University Hospital ethical committee.

Results

Patients undergoing alloHSCT due to oncological reasons were more numerous than those transplanted because of non-oncological conditions. The mean eGFR values were above 90 mL/min/1.73 m² in all patients before transplantation, independent of the underlying disease (Fig. 3,4). None of the patients presented with eGFR < 60 mL/min/1.73 m² before alloHSCT. The peak eGFR values were observed 1 day and 1 week after alloHSCT in both groups (Fig. 3,4). Then, they returned to those observed before the treatment after 1 week (non-oncological patients) or after 2 weeks (oncological patients). From that turning point, mean eGFR in oncological children remained lower than before alloHSCT and decreased significantly at each time point from the 4th week until the 6th month of observation

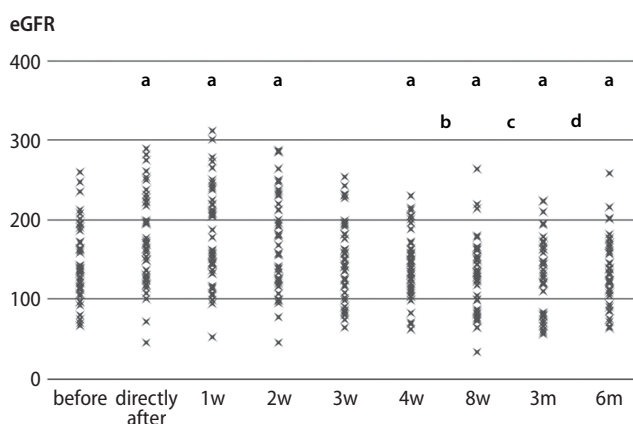


Fig. 3. The values of estimated glomerular filtration rate (eGFR) in oncological patients

before – before alloHSCT; directly after – 24 h after alloHSCT; 1w – 1 week after alloHSCT; 3m – 3 months after alloHSCT; a – $p < 0.05$ any time point compared to before alloHSCT; b – $p < 0.05$ 8 weeks compared to 4 weeks after alloHSCT; c – $p < 0.05$ 3 months compared to 8 weeks after alloHSCT; d – $p < 0.05$ 6 months compared to 3 months after alloHSCT.

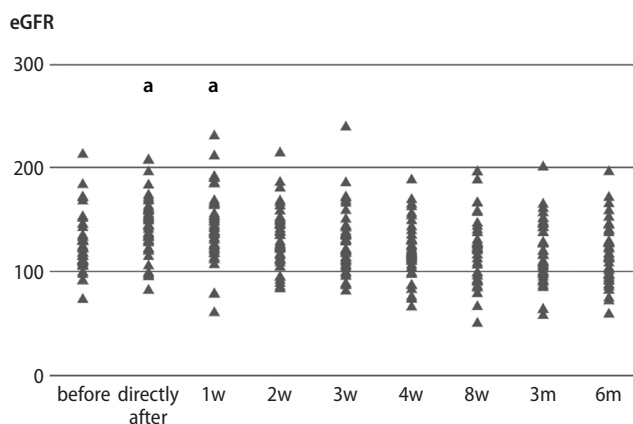


Fig. 4. The values of estimated glomerular filtration rate (eGFR) in non-oncological patients

before – before alloHSCT; directly after – 24 h after alloHSCT; 1w – 1 week after alloHSCT; 3m – 3 months after alloHSCT; a – $p < 0.05$ any time point compared to before alloHSCT.

Table 1. Incidence of acute kidney injury in examined patients

Pediatric(p)RIFLE criteria		1 day after alloHSCT	1 week after alloHSCT	2 weeks after alloHSCT	3 weeks after alloHSCT	4 weeks after alloHSCT	8 weeks after alloHSCT	3 months after alloHSCT	6 months after alloHSCT
Oncological patients	Risk (↓ eGFR > 25%)	1 (1.1%)	0	7 (7.9%)	13 (14.6%)	16 (18.0%)	31 (34.8%)	21 (23.6%)	18 (20.2%)
	Injury (↓ eGFR > 50%)	1 (1.1%)	0	1 (1.1%)	1 (1.1%)	0	2 (2.2%)	6 (6.7%)	0
Non-oncological patients	Risk (↓ eGFR > 25%)	0	1 (2.2%)	4 (8.9%)	3 (6.7%)	9 (20.0%)	8 (17.8%)	8 (17.8%)	5 (11.1%)
	Injury (↓ eGFR > 50%)	1 (2.2%)	0	0	0	0	1 (2.2%)	1 (2.2%)	0

eGFR – estimated glomerular filtration rate; alloHSCT – allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

(Fig. 3). Contrarily, mean eGFR in non-oncological patients remained stable and comparable to pre-transplantation records, from the 3rd week until the 6th month of follow-up (Fig. 4).

The incidence of AKI at subsequent time points before and after alloHSCT varied with time (Table 1). In the entire time interval (0–6 months after transplantation), 54% of patients demonstrated the features of AKI according to the pRIFLE criteria. The risk stage (R) appeared at least once in 58 patients (41 oncological and 17 non-oncological) and the injury stage (I) in 14 patients (11 oncological and 3 non-oncological). The biggest number of AKI episodes was noticed 8 weeks after alloHSCT and the R incidence was then significantly higher in oncological than in non-oncological patients ($\chi^2 = 4.5$; $p = 0.034$). None of the patients experienced the failure stage (F) with eGFR decrease exceeding 75%.

After 6 months, oncological patients demonstrated significantly diminished eGFR values compared to the pre-transplantation records, whereas in non-oncological children these values were comparable (Fig. 3,4). In 12 children, eGFR values varied between 60 mL/min/1.73 m² and 89 mL/min/1.73 m², whereas in 2 patients eGFR dropped below 60 mL/min/1.73 m².

During the observation period, 10 patients died (0.7%). One death was a direct consequence of allotransplantation (20 days after HSCT), while the remaining ones were associated with late, non-nephrological complications. None of the patients, observed for up to 6 months, required renal replacement therapy.

Discussion

The incidence of AKI throughout the 6-month observation period in our study group was as high as 54%. Our data are concordant with the estimations performed by other authors, stressing the importance of renal function follow-up in the post-HSCT period.^{13,15,16}

Indeed, the post-HSCT renal dysfunction is a well-documented phenomenon among adult patients, analyzed from

the perspectives of AKI incidence, other comorbidities, long-term outcome, and mortality.²¹ Recent meta-analysis proved that, despite progress in diagnosing AKI, its incidence in adults remains high and affects more than 50% of patients undergoing HSCT.²² However, analyses in pediatric patients concentrated rather on the impact of AKI on overall mortality or long-term prognosis than on aspects of early renal dysfunction and its consequences.^{13–16}

The higher incidence of AKI among patients after allotransplantation compared to autotransplantation is also well-known and has justified our decision to concentrate on children undergoing alloHSCT.^{22,23} The pediatric specificity gave us a unique opportunity to confront the 2 subpopulations – those with the flagship oncological reason for HSCT with those who had indications like immune deficiencies and inborn metabolic disorders, non-existent in adult patients qualified for HSCT. We have reported the preponderance of children transplanted due to oncological reasons over those treated with HSCT because of non-oncological indications. The evaluation of AKI incidence in the whole group revealed that R was diagnosed over 4 times more often than I. In detail, R concerned 43% of all children after alloHSCT (46% of oncological and 37% of non-oncological patients), whereas I affected 10% of the whole studied group (12% of oncological patients and less than 1% of non-oncological patients). Despite discrepancies in the number and percentage of patients affected by R or I between 2 subgroups, these differences reached statistical significance at only 1 time point. Eight weeks after transplantation, the R incidence was higher among oncological patients compared to non-oncological children.

The pattern of fluctuations in the AKI incidence also seemed similar in both groups. The number of R patients peaked between the 4th and 8th week after alloHSCT (irrespective of the analyzed group), then stabilized (non-oncological) or even diminished (oncological) until the 6th month of observation. Patients classified to I were clinically significant in number only in the oncological population 3 months after alloHSCT. Otherwise, single cases were noticed throughout the whole observation period.

The similar overall AKI incidence and its fluctuations during observation period in both groups may result from the fact that there were no significant differences in treatment regimens or severity of complications between oncological and non-oncological patients. The vast majority of children followed myeloablative protocols and similar GVHD prophylaxis. The incidence of GVHD or infections did not differ between the subgroups.

However, the abovementioned similarity in both subgroups stayed in contrast with the parameters of renal function. The eGFR values and the incidence of hyperfiltration were significantly higher in oncological compared to non-oncological patients. Hyperfiltration is a recognized condition in children with malignancies, increasing in frequency with subsequent cycles of chemotherapy and connected with the patients' hypermetabolic state.²⁴ The routine procedures during first 3 weeks after HSCT, like intravenous nourishment and additional fluid intake at the amount of 3 L/m²/day with subsequent administration of diuretics if needed, may add to already increased eGFR values. Indeed, in our patients a significant elevation of eGFR values was detected 24 h and one week after alloHSCT.

Therefore, the eGFR discrepancy between oncological and non-oncological patients, persisting only until the 4th week after the procedure, was aggravated by iatrogenic interventions. When intravenous supplementation was ceased, the tendency reversed and from the 8th week after alloHSCT eGFR values were similar in both groups. However, an alarming trend appeared from the 4th week after alloHSCT. The eGFR values in oncological patients decreased systematically until the 6th month of observation. Such a result may suggest possible long-term renal function deterioration, but longer observation is needed to confirm this hypothesis.

Our study has limitations. This retrospective report contained data collected according to hematological protocols. Therefore, a few nephrological aspects are missing, such as urine output or cystatin C measurements. Both groups were heterogeneous, especially in the case of non-oncological patients. The majority of patients were followed up regularly only until the 3rd month after alloHSCT; some of them were then transferred to the hematological centers near home. Thus, the analysis longer than 6 months was not possible.

Conclusions

The AKI incidence in children undergoing alloHSCT is independent of indication for this procedure, whereas eGFR values seem conditioned by previous chemotherapy in oncological patients. Children undergoing alloHSCT due to oncological reasons are at a greater risk of renal dysfunction 6 months after transplantation than the population with non-oncological indications for this therapy.

ORCID iDs

Monika Augustynowicz  <https://orcid.org/0000-0002-3229-2832>
 Krzysztof Kałwak  <https://orcid.org/0000-0003-1174-5799>
 Danuta Zwolińska  <https://orcid.org/0000-0002-6714-3992>
 Kinga Musiał  <https://orcid.org/0000-0002-9000-7585>

References

- Slatter MA, Gennery AR. Hematopoietic cell transplantation in primary immunodeficiency: Conventional and emerging indications. *Exp Rev Clin Immunol*. 2008;14(2):103–114.
- Xu L, Chen H, Chen J, et al. The consensus on indications, conditioning regimen and donor selection of allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological diseases in China: Recommendations from the Chinese Society of Hematology. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):33. doi:10.1186/s13045-018-0564-x
- Sureda A, Bader P, Cesaro S, et al. Indications for allo- and auto-HSCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: Current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(8):1037–1056.
- Hołowiecki J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol Arch Med Wewn*. 2008;118(11):658–662.
- Hierlmeier S, Eyrich M, Wölfl M, Schlegel PG, Wiegand V. Early and late complications following hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients: A retrospective analysis over 11 years. *PLoS One*. 2018;13(10):e0204914. doi:10.1371/journal.pone.0204914
- Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirel T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother*. 2016;22(8):505–514.
- Harris AC, Young R, Devine S, et al. International, multi-center standardization of acute graft versus host disease clinical data collection: A report from the MAGIC consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):4–10.
- Ciki K, Dogru D, Kuskonmaz B, et al. Pulmonary complications following hematopoietic stem cell transplantation in children. *Turk J Ped*. 2019;61(1):59–70.
- Wanchoo R, Stotter BR, Bayer RL, Jhaveri KD. Acute kidney injury in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Crit Care*. 2019;25(6):531–538.
- Zeng X, McMahon GM, Brunelli SM, Bates DW, Waikar SW. Incidence, outcomes, and comparisons across definitions of AKI in hospitalized individuals. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(1):12–20.
- Ando M. An overview of kidney disease following hematopoietic cell transplantation. *Int Med*. 2018;57(11):1503–1508.
- Ileri TL, Ertem M, Ozcakar ZB, et al. Prospective evaluation of acute and chronic renal function in children following matched related donor hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant*. 2010;14(1):138–144.
- Koh KN, Sunkara A, Kang G. Acute kidney injury in pediatric patients receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation: Incidence, risk factors and outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(4):758–764.
- Raina R, Herrera N, Krishnappa V, et al. Hematopoietic stem cell transplantation and acute kidney injury in children: A comprehensive review. *Pediatr Transplant*. 2017;21(4):e12935. doi:10.1111/ptr.12935
- Didsbury MS, Mackie FE, Kennedy SE. A systematic review of acute kidney injury in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant*. 2015;19(5):460–470.
- Kizilbash SJ, Kashtan CE, Chavers BM, Cao Q, Smith AR. Acute kidney injury and the risk of mortality in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(7):1264–1270.
- Sutherland SM, Byrnes JJ, Kothari M, et al. AKI in hospitalized children: Comparing the pRIFLE, AKIN and KDIGO definitions. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(4):554–561.
- Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(3):629–637.
- Cachat F, Combesure C, Cauderay M, Girardin E, Chehade H. A systematic review of glomerular hyperfiltration assessment and definition in the medical literature. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(3):382–389.
- Iduoriyekemwen NJ, Ibadin MO, Aikhionbare HA, Idogun SE, Abiodun MT. Glomerular hyperfiltration in excess weight adolescents. *Niger J Clin Pract*. 2019;22(6):842–848.

21. Krishnappa V, Gupta M, Manu G, Kwatra S, Owusu OT, Raina R. Acute kidney injury in hematopoietic stem cell transplantation: A review. *Int J Nephrol*. 2016;2016:5163789. doi:10.1155/2016/5163789
22. Kanduri SR, Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, et al. Incidence and mortality of acute kidney injury in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A systematic review and meta-analysis. *QJM*. 2020;113(9):621–632. doi:10.1093/qjmed/hcaa072
23. Caliskan Y, Besik SK, Sargin D, Ecder T. Early renal injury after myeloablative allogeneic and autologous hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38(2):141–147.
24. Kwatra NS, Meany HJ, Ghelani SJ, Zahavi D, Pandya N, Majd M. Glomerular hyperfiltration in children with cancer: Prevalence and a hypothesis. *Pediatr Radiol*. 2017;47(2):221–226.



Article

Clusterin as a New Marker of Kidney Injury in Children Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation—A Pilot Study [†]

Kinga Musiał ^{1,*} , Monika Augustynowicz ¹, Izabella Miśkiewicz-Migoń ²,
Krzysztof Kalwak ² , Marek Ussowicz ² and Danuta Zwolińska ¹

¹ Department of Pediatric Nephrology, Wrocław Medical University, 50-556 Wrocław, Poland; monika.augustynowicz@umed.wroc.pl (M.A.); danuta.zwolinska@umed.wroc.pl (D.Z.)

² Department of Bone Marrow Transplantation, Oncology and Pediatric Hematology, Wrocław Medical University, 50-556 Wrocław, Poland; imiskiewicz@usk.wroc.pl (I.M.-M.); krzysztof.kalwak@umed.wroc.pl (K.K.); marek.ussowicz@umed.wroc.pl (M.U.)

* Correspondence: kinga.musial@umed.wroc.pl

[†] Short title: Clusterin in children after alloHSCT.

Received: 18 July 2020; Accepted: 9 August 2020; Published: 11 August 2020



Abstract: Background and aims: The markers of renal damage defining subclinical AKI are not widely used in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). The aim of the study was to evaluate serum and urinary clusterin as indices of kidney injury after alloHSCT in relation to damage (kidney injury molecule (KIM)-1) and functional (cystatin C) markers. Material and methods: Serum and urinary clusterin, KIM-1 and cystatin C concentrations were assessed by ELISA in 27 children before alloHSCT, 24 h, 1, 2, 3 and 4 weeks after alloHSCT and in controls. Results: All parameters were significantly higher in HSCT patients compared to controls even before the transplantation. The serum concentrations increased after HSCT and this rising trend was kept until the third (clusterin) or 4th (KIM-1, cystatin C) week. Urinary clusterin and KIM-1 were elevated until the third week and then decreased yet remained higher than before HSCT. Urinary cystatin C has risen from the second week after HSCT and decreased after the third week but was still higher than before alloHSCT. Conclusions: The features of kidney injury are present even before alloHSCT. Clusterin seems useful in the assessment of subclinical AKI and may become a new early marker of sublethal kidney injury in children.

Keywords: acute kidney injury; cystatin C; hyperfiltration; kidney injury molecule (KIM)-1; tubular damage

1. Introduction

Renal tubular epithelial cells are prone to hypoxia and metabolic stress, thus they become first target cells in the course of kidney injury. Contrast-induced nephropathy is a classic example of reversible acute kidney injury (AKI) with tubular involvement [1]. Animal and human studies showed that contrast administration triggers both systemic and renal cytotoxic effects [2,3]. However, if the conditions are unfavorable, further irreversible changes may lead to progression to chronic kidney disease [4].

Acute kidney injury is a well-documented phenomenon characteristic for HSCT [5–8]. However, most studies on AKI take into account the KDIGO classifications, focusing on the serum creatinine values and diuresis [9]. Such criteria do not ease the AKI diagnosis. In order to secure the patient with positive fluid balance and prevent oliguria, additional hydration and forced diuresis are implemented. These conditions may bias the values of estimated glomerular filtration rate (eGFR) and urine output.

Recent classifications have expanded the definition of AKI beyond the functional criteria. They distinguish four options, based on the combined evaluation of function and damage markers [10]. This new approach defines normal renal function as an absence of any index alteration, subclinical AKI as an isolated increase of any damage marker, functional AKI when solely function markers are modified and combined AKI with both function and damage markers altered [10,11].

The search for new markers was conditioned by the failure of serum creatinine as an early marker of renal function decrement. The indices of cellular damage—especially of tubular injury—are of particular interest as new markers of the so-called “subclinical AKI” [10]. The preliminary studies concerning children after cardiosurgery or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) proved that combination of the biomarkers of renal function and tubular damage may be of added value in the early diagnosis of AKI [12,13].

Indeed, the risk of AKI is increased in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), mainly due to the nephrotoxicity of drugs. Additionally, renal hypoperfusion, infections and immune complications (including graft versus host disease) count. Moreover, patients with allogeneic HSCT suffer from AKI more often than those undergoing the autologous transplantation [14,15]. The assessment of renal function in the early (up to 28 days) post-transplantation period seems of paramount importance, because it may reveal the potential direction of future changes into either full renal recovery or acute kidney disease or chronic kidney disease [16,17]. First promising results in the population of children undergoing HSCT should urge further search for reliable early markers of kidney injury [13].

2. Aim of Study

Therefore, the objective of the study was to assess the usefulness of serum and urinary clusterin as new indices of kidney injury in the early post-HSCT period in relation to other renal damage (KIM-1) and functional (cystatin C) markers and to estimate their potential value as factors differentiating between children transplanted because of oncological and non-oncological reasons.

3. Material and Methods

3.1. Study Design and Settings

This observational pilot study concerned 27 children (15 girls, 12 boys) undergoing first alloHSCT in the Department of Bone Marrow Transplantation, Pediatric Oncology and Hematology, in 2019 (patient flow is shown in Figure 1). The observation period started before introducing conditioning therapy, then parameter examinations were performed 24 h, 1, 2, 3 and 4 weeks after HSCT.

The exclusion criteria for the patients were the age below 2 years and over 18 years, autologous HSCT and retransplantation. The whole alloHSCT group contained 27 patients (median age 4.5 years, interquartile range 3.1–8.0 years). The subdivision into two groups was carried out depending on the indications for allotransplantation. Seventeen patients (median age 6.6 years, interquartile range 4.0–9.8 years) were qualified for transplantation due to oncological reasons, 10 (median age 4.5 years, interquartile range 3.1–7.0 years) underwent HSCT due to non-oncological indications (mainly severe aplastic anemia). In 79% of cases the donor was unrelated, in 18%-related and in 3%-haploidentical.

The conditioning therapy concerned myeloablative (busulfan, cyclophosphamide and fludarabine or fludarabine, treosulfan, thiotepa) or non-myeloablative (cyclophosphamide, fludarabine) regimens. In most patients graft versus host disease (GvHD) protocol contained pre-HSCT ATG, cyclosporine A since 1 day before HSCT and methotrexate given in the 1st, 3rd and 6th day after transplantation. Nineteen out of 27 patients developed GvHD. None of the patients died in the observation period.

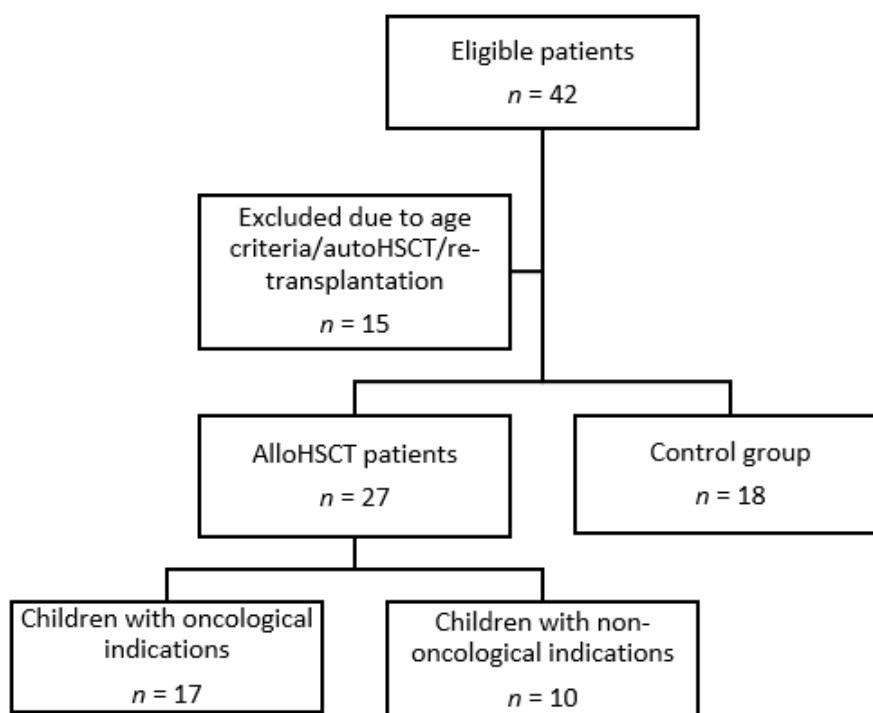


Figure 1. Patient flow.

The control group contained 18 age-matched children (9 girls, 9 boys; median age 7.8 years, interquartile range 7.0–9.8 years) with monosymptomatic nocturnal enuresis and normal kidney function. Informed consent was obtained from the patients over 16 and their parents, if necessary.

3.2. Methods

Blood samples were drawn from peripheral veins after an overnight fast. Samples were clotted for 30 min, centrifuged at room temperature, 1000 g for 15 min, then serum was stored at -80°C until assayed. Urine was collected aseptically from the first morning sample, centrifuged at room temperature, 1000 g for 15 min and then stored at -80°C until assayed.

The serum and urine concentrations of clusterin, cystatin C and KIM-1 were evaluated by commercially available ELISA kits (clusterin EIAab, reagent kit E1180h; cystatin C R & D Systems, reagent kit DSCTC0; KIM-1 EIAab, reagent kit E0785 h). Standards, serum and urine samples were transferred to 96-well microplates precoated with recombinant antibodies to human clusterin, cystatin C, KIM-1 and creatinine. Captured proteins were then detected using monoclonal antibodies against clusterin, cystatin C and KIM-1 conjugated to horseradish peroxidase. Next, the assay was developed with tetramethylbenzidine substrate and blue color was developed proportionately to the amount of captured protein. The addition of acid stop solution ended the color development and converted it to the endpoint yellow. The intensity of the latter was measured in a microplate reader at 450 nm, with the correction wavelength at 550/650 nm. Each sample was tested in duplicate and the arithmetical mean was considered a final result. Measurements were performed according to the manufacturer's instructions; results were calculated by reference to standard curves. Detection limits were as follows: clusterin 1.56 ng/mL; cystatin C 3.13 ng/mL; KIM-1 0.15 ng/mL. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (% CV) for examined parameters did not exceed 8.5% and 9.4%, respectively.

The assessment of kidney function relied on hematological protocols assessing serum creatinine in fixed time points. Serum and urine chemistry parameters were measured using automated routine

diagnostic tests on the Beckman Coulter AU2700 analyzer. The serum creatinine was assessed with the use of enzymatic method (creatinine OSR61204 reagent, creatininase–sarcosine oxidase reactions). Serum and urine concentrations of all parameters was measured before conditioning, 24 h after allotransplantation and then 1 week, 2, 3, 4 weeks after alloHSCT. eGFR was calculated in all time points, based on the Schwarz formula [18]. The eGFR changes were confronted with the pre-transplantation values.

All urinary concentrations of evaluated parameters were normalized to urinary creatinine values.

AKI was diagnosed based on the pRIFLE criteria [9]. Hyperfiltration was defined as eGFR \geq 140 mL/min/1.73 m², according to recent meta-analysis and pediatric experience [19,20].

3.3. Statistical Analysis

Results were expressed as median values and interquartile ranges. The null hypothesis of normality of distribution of analyzed variables was rejected by Shapiro–Wilk test. Thus, the comparisons between paired and unpaired data were evaluated by using nonparametric tests (Friedman, Wilcoxon, Kruskal–Wallis, Mann–Whitney U). The correlations between parameters were assessed with the use of Spearman’s correlation coefficient R. Statistical analysis was performed using the package Statistica ver. 13.3 (StatSoft). A *p*-value < 0.05 was considered significant.

4. Results

None of the patients presented with eGFR < 60 mL/min/1.73 m² and median eGFR values in both groups were above 90 mL/min/1.73 m² at any time point (Table 1) Most oncological patients demonstrated hyperfiltration until the 3rd week after transplantation (with peak incidence in the first week after HSCT). Non-oncological children with eGFR > 140 mL/min/1.73 m² were in minority. The median eGFR values in non-oncological children were comparable to those of the controls during the whole study except for the early (24 h after HSCT) measurement, when they became significantly higher (Table 1). Contrarily, the eGFR records in oncological patients remained significantly elevated compared to controls from point zero until the 3rd week after alloHSCT. They were increased throughout the whole study period compared to the non-oncological patients (Table 1).

Table 1. eGFR values in examined groups.

eGFR (mL/min/1.73 m ²) Median Value (Interquartile Range)	Before alloHSCT	24 h after alloHSCT	1 Week after alloHSCT	2 Weeks after alloHSCT	3 Weeks after alloHSCT	4 Weeks after alloHSCT
Oncological patients	142 (112–149) ^a	183 (153–216) ^{a,b}	172 (155–205) ^{a,b}	188 (166–195) ^{a,b}	149 (140–174) ^{a,b,c}	134 (123–149) ^{a,c}
Non-oncological patients	107 (96–129)	140 (126–176) ^b	131 (118–149) ^b	130 (114–136) ^b	129 (100–145) ^b	126 (92–134)

^a *p* < 0.05 oncological pts vs. non-oncological pts; ^b *p* < 0.05 any time point vs. before alloHSCT; ^c *p* < 0.05 2 weeks after vs. 3 weeks after; eGFR estimated glomerular filtration rate; alloHSCT allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

The urinary clusterin, KIM-1 and cystatin C concentrations were significantly elevated in all patients compared to controls, irrespective of the indication for transplantation (oncological or non-oncological), even before alloHSCT. Normalization of the urinary concentrations of clusterin, KIM-1 and cystatin C for urinary creatinine maintained these differences (Figures 2–4). In the case of clusterin, the urinary values have increased nearly 3-fold 24 h after transplantation, then kept the plateau phase until the second week and rose again in the 3rd week. Finally, they decreased in the 4th week after HSCT, yet remained higher than before HSCT (Figure 2). The urinary KIM-1 values rose by 50% 24 h after HSCT, then kept growing until the 3rd week and finally decreased (Figure 3). Urinary cystatin C demonstrated the delayed elevation from the 2nd week after transplantation, lasting only until the 3rd week and followed by a significant decrease 1 week later (Figure 4). After 4 weeks of observation, all urinary biomarkers were still significantly elevated compared to the pre-transplantation values.

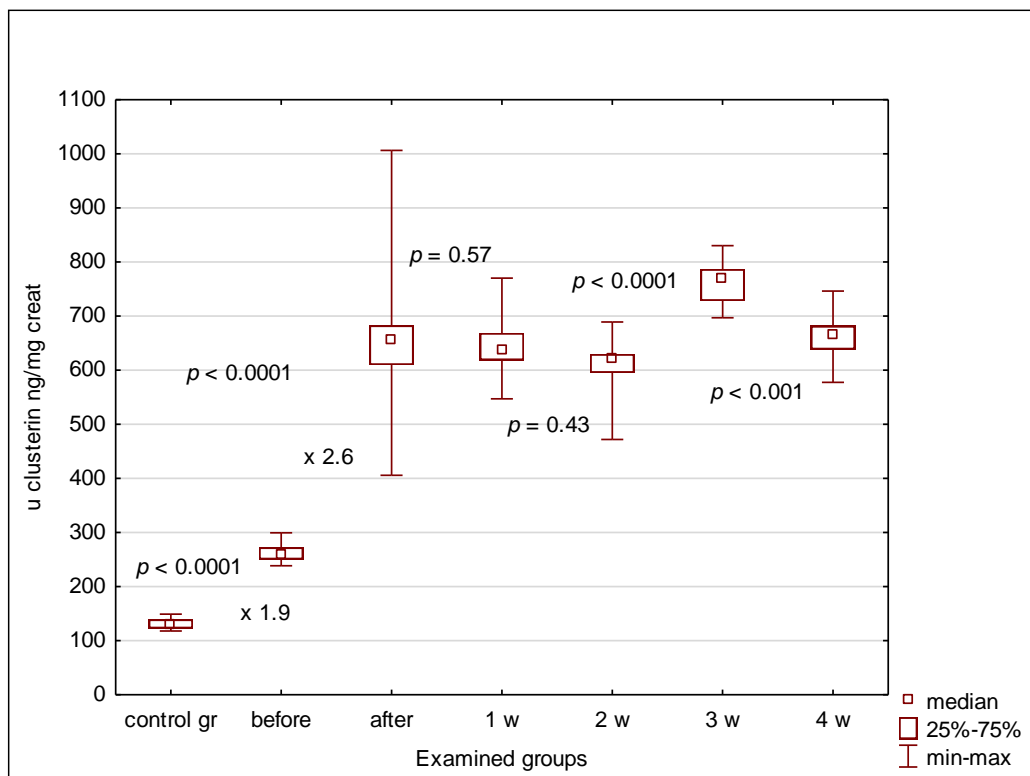


Figure 2. Urinary clusterin values in examined groups. before—before alloHSCT; after—24 h after alloHSCT; 1 w (2 w, 3 w, 4 w)—1 week (2, 3, 4 weeks) after alloHSCT.

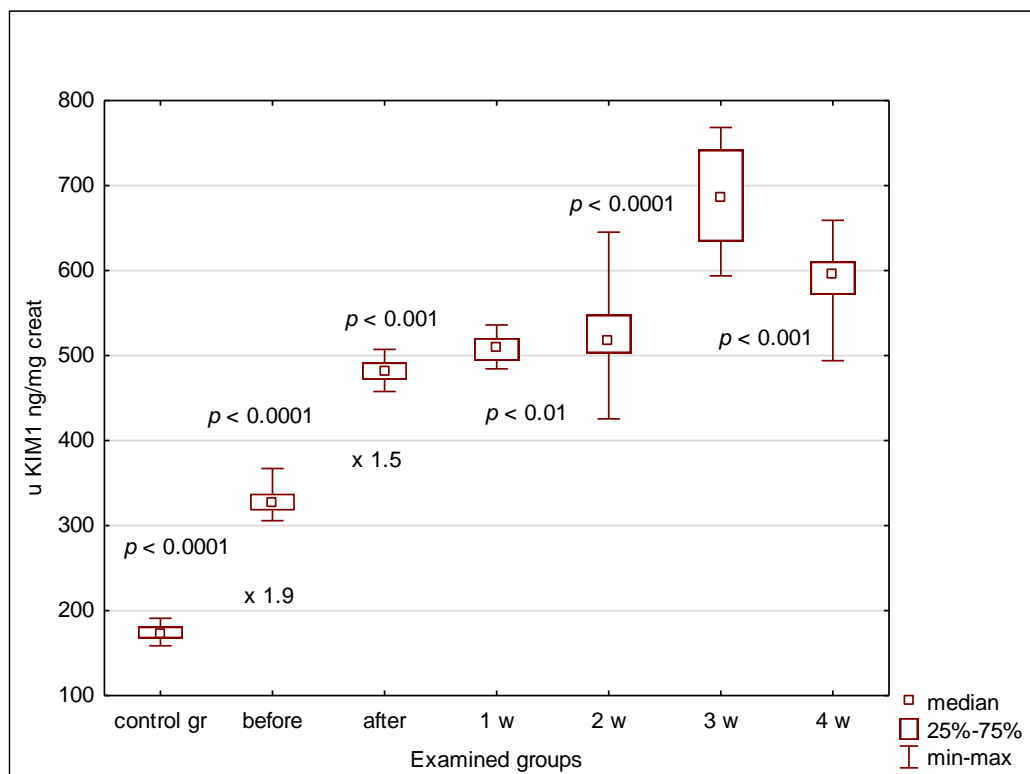


Figure 3. Urinary KIM-1 values in examined groups. before—before alloHSCT; after—24 h after alloHSCT; 1 w (2 w, 3 w, 4 w)—1 week (2, 3, 4 weeks) after alloHSCT.

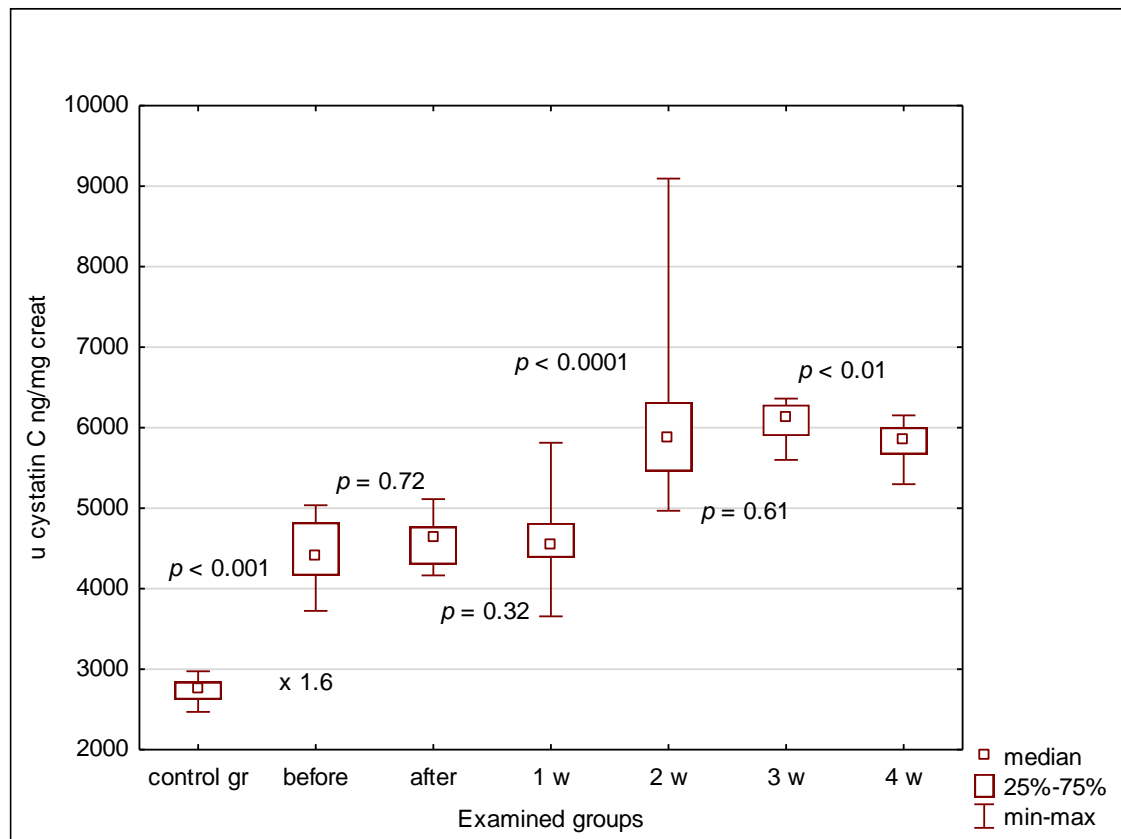


Figure 4. Urinary cystatin C values in examined groups. before—before alloHSCT; after—24 h after alloHSCT; 1 w (2 w, 3 w, 4 w)—1 week (2, 3, 4 weeks) after alloHSCT.

The serum concentrations of clusterin, KIM-1 and cystatin C in children before transplantation were significantly higher than in controls (Table 2). The serum values further increased 24 h after HSCT and the rise was most spectacular in the case of clusterin (over 2-fold) compared to 50%–60% elevation of other markers. Then the concentrations rose systematically until the 3rd week (clusterin) or 4th week (KIM-1, cystatin C) after alloHSCT. There was no significant difference in the urinary or serum marker values between oncological and non-oncological patients at any time point (Table 2).

Table 2. Serum parameter values in examined groups.

Serum Parameter Median Value (Interquartile Range)	s Clusterin (ng/mL)	s KIM1 (ng/mL)	s Cystatin C (ng/mL)
Control group	1.3 (1.2–1.4)	2.3 (2.2–2.4)	148 (141.7–164.3)
Before alloHSCT	3.1 (3.0–3.1) ^a	4.2 (4.1–4.3) ^a	408 (387.6–433) ^a
24 hafter alloHSCT	7.9 (7.2–8.4) ^{a,b}	6.7 (6.3–6.8) ^{a,b}	634.8 (604.6–689.1) ^{a,b}
1 week after alloHSCT	8.9 (8.8–9.1) ^{a,c}	6.7 (6.0–6.8) ^a	905.6 (879–961.6) ^{a,c}
2 weeks after alloHSCT	9.5 (9.3–10) ^{a,d}	8 (7.8–8.2) ^{a,d}	898 (878.7–926.3) ^a
3 weeks after alloHSCT	13.3 (12.8–13.6) ^{a,e}	8.9 (8.8–8.9) ^{a,e}	1106 (1053–1157) ^{a,e}
4 weeks after alloHSCT	13.3 (12.8–13.6) ^a	9.2 (9.1–9.2) ^{a,f}	1262 (1222–1288) ^{a,f}

^a $p < 0.05$ any time point vs. control group; ^b $p < 0.05$ 24 h after alloHSCT vs. before alloHSCT; ^c $p < 0.05$ 1 week after alloHSCT vs. 24 h after alloHSCT; ^d $p < 0.05$ 2 weeks after alloHSCT vs. 1 week after alloHSCT; ^e $p < 0.05$ 3 weeks after alloHSCT vs. 2 weeks after alloHSCT; ^f $p < 0.05$ 4 weeks after alloHSCT vs. 3 weeks after alloHSCT. No significant correlations were detected between the analyzed parameters.

AKI was diagnosed in 4 patients (3 oncological and 1 non-oncological), according to the pRIFLE criteria. Risk stage was diagnosed in 3 of them, 1 developed Injury stage. None of the patients required renal replacement therapy.

5. Discussion

Although AKI is a common finding in the patients undergoing alloHSCT, most of the classifications assessing the degree of renal impairment concentrate on the functional indices. However, damage markers seem a promising and objective alternative in the assessment of kidney injury. The fact that the number of potential AKI markers is increasing proves that the problem is emerging. Thus, our aim was to confront the known indices of tubular injury (KIM-1) and glomerular function (cystatin C, eGFR) with a new marker of cellular stress and damage. Clusterin has not been analyzed in a specific population of patients undergoing HSCT so far.

Every patient in this study group, irrespective of the indication for HSCT, demonstrated the features of cellular damage seen even before the procedure of transplantation. The interpretation of this unexpected result was quite challenging, because up-to-date studies on the populations undergoing HSCT have never compared their records to those of age-matched controls with normal renal function and no history of kidney injury. The pre-transplantation therapies, including chemotherapeutics and nephrotoxic drugs, seem of paramount importance as an explanation for this phenomenon. Indeed, all patients transplanted due to oncological reasons have undergone series of chemotherapies, whereas many of the non-oncological children were treated with potentially nephrotoxic antibiotics prior to alloHSCT. All these interventions were related to their primary diagnoses and could trigger the pre-transplantation subclinical kidney damage. Irrespective of the underlying cause, such observation would suggest that subclinical background is a common finding and, thus, the key player in the HSCT-related AKI.

The post-transplantation aggravation of cellular damage was rather predictable, taking into account the nephrotoxic and cytotoxic potentials of conditioning regimens, anti-GvHD prophylaxis and treatment of infections. The essential finding was that these signs of injury concerned both serum and urine, depicting not only renal, but also systemic cell damage after HSCT.

Among all analyzed parameters, the serum and urinary clusterin values have shown the most spectacular changes in children before HSCT compared to controls and before HSCT compared to 24 h after HSCT. The serum and urinary values before transplantation were at least two times higher than in controls and rose over 2.5-fold after transplantation. In the meantime, the other serum markers increased by no more than 60%, whereas the urinary values became 14% higher (KIM-1) or remained unchanged (cystatin C). Only in the case of clusterin the post-HSCT response was more spectacular than the difference between control group and pre-HSCT values.

Clusterin is a 75–80 kDa heat shock protein secreted by both epithelial and secretory cells in response to stress. Its protective and anti-apoptotic roles against renal ischemia-reperfusion injury have been demonstrated in murine kidneys [21]. Interestingly, clusterin was detected in both renal tubular epithelial and mesangial cells. Its decreased expression aggravated postischemic renal injury, as well as proteinuria in the course of glomerulopathy. Clusterin knockout mice suffered from the progression of renal inflammation and fibrosis after ischemia-reperfusion injury [22]. Investigation concerning humans is restricted to single reports on the urinary clusterin in patients with diabetes mellitus and promising results of a diagnostic multi-biomarker kit including urine clusterin in the scope of indices of chronic kidney injury [23,24].

Taking into account the experimental data, the above mentioned reports and our results, we could put forward the hypothesis about the protective role of clusterin in the kidney injury due to HSCT. Such presumption would provide the explanation for increasing levels in both serum and urine as a response to systemic and kidney stress conditions. Moreover, clusterin has turned out the most accurate marker predicting drug-induced AKI in adults, better than cystatin C or KIM-1 [25]. Interestingly, all three markers became higher compared to non-AKI controls already 1–3 days before the onset of AKI.

This may suggest the reason for the early pre-transplant elevation of all indices compared to healthy controls. It also shows the added value of all tested markers in diagnosing nephrotoxicity. Moreover, yet, testing big cohorts may give unequivocal results in the pediatric population, questioning for example the accuracy of KIM-1 as a predictor of AKI in children [26].

In our study group, urinary KIM-1 behaved similarly to urinary clusterin, although the elevation after HSCT did not reach 50%. However, the rising trend persisted until the third week and then a significant decrease was noticed. Yet, the values remained higher than before transplantation. Such scheme would talk into the tubular damage aggravating since the HSCT procedure. The serum KIM-1 concentrations kept the systematic growth throughout the whole observation period, except for the plateau phase between 24 h and one week after HSCT. These results have suggested the ongoing tubular damage in the course of HSCT procedure, triggered most probably by nephrotoxic drugs. Increased serum KIM-1 could point at its release by the cells damaged in the course of conditioning therapy, anti-GvHD prophylaxis or current infection treatment, as well as the accumulation of a molecule that cannot be filtered freely through glomeruli due to its molecular mass of 90–110 kDa. The possible long-term consequence has been discovered in experimental studies, when chronic KIM-1 elevation in mice promoted fibrosis, thus linking AKI to CKD [27].

However, both abovementioned markers seemed similar in the mode of early reaction to kidney injury. The usefulness of clusterin and KIM-1 could be strengthened by the fact that their elevated serum and urine values were noticed even before transplantation, both in oncological and non-oncological patients, whereas pre-transplantation eGFR changes concerned only oncological children. In detail, their eGFR values were significantly higher compared to controls and most of the patients demonstrated hyperfiltration. This finding was confirmed by other authors, who put the main stress on hypermetabolic states and previous chemotherapy as causative factors of hyperfiltration [28]. The eGFR discrepancies could also be the consequence of many transplant-related covariates like catabolism, inflammation or weight loss, directly influencing serum creatinine [29].

Whether this hyperfiltration could be the early sign of progression into chronic kidney injury, remains unexplained, because the longer time of observation would be needed. However, the elevation of both damage parameters and eGFR could be the proof for the pre-transplantation kidney injury in oncological patients. This finding justifies the current attempts to prevent renal injury or at least to minimize the impact of potential nephrotoxins on the kidney. The reduction of nephrotoxic exposure is one of the effective tools already used in oncological patients [30]. The animal models suggest the possibility to prevent AKI with the use of phosphodiesterase-5 inhibitors prior to potentially nephrotoxic treatment [31,32]. Independent of the chosen strategy, the threat of renal injury should urge careful follow-up of the patient in order to avoid additional insults triggering irreversible damage to the kidney.

Cystatin C is an established marker of glomerular function and a good predictor of AKI in children, so it seemed a good candidate to verify the abovementioned discrepant eGFR results. However, it did not confirm differences between oncological and non-oncological patients [33]. Out of the three examined markers, cystatin C was the only one with low molecular weight (13 kDa) freely filtered through glomeruli. Therefore, the fact that the elevation of cystatin C in serum has outrun the increase of the urinary value was the direct proof of the serum origin of cystatin C found in the urine. Having said that, the increased values of urinary clusterin and KIM-1, both of higher molecular weight than cystatin C, must have been of tubular cell origin. Therefore, their elevation was probably proportionate to the degree of cell damage and, in case of clusterin, to the intensity of protective mechanisms against kidney injury.

Summarizing, in our study clusterin has outperformed the targeted glomerular (cystatin C) and tubular (KIM-1) indices of kidney function. Therefore, it seems a promising early marker of the sublethal kidney injury, covering both tubular and glomerular spectrum of renal damage. Whether clusterin may become a duplex renal functional and damage marker, is yet to be established in the studies performed on a larger group of patients.

We also must acknowledge the limitations of our study. First, the clinical data were collected according to the hematological protocols, not taking into account all nephrological aspects. Thus, the full information about urine output is missing. This is the first report on the clusterin serum and urinary values in children, so it is impossible to confront them with the age-related reference values. We are also aware of the low number of patients and the heterogeneity of examined groups, which limits the power of conclusions and urges the continuation of the study throughout a longer period on a larger group of patients.

6. Conclusions

All children demonstrated the features of cell damage already before alloHSCT; thus, the subclinical AKI is a common finding in this population. Clusterin seems more useful in the assessment of subclinical AKI than the classical indices of tubular (KIM-1) and glomerular (cystatin C) damage analyzed separately. It may become a new early marker of sublethal kidney injury in this group of patients.

Author Contributions: Conceptualization: K.M., M.A., D.Z.; investigation: K.M., M.A., I.M.-M., M.U.; resources: I.M.-M., K.K., M.U.; formal analysis: K.M.; writing—original draft: K.M. writing—review and editing: K.M., D.Z.; visualization: K.M.; funding acquisition: K.K., D.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The project was financed by the Foundation “Na Ratunek Dzieciom z Chorobą Nowotworową” (FNRD.C210.19.002).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

Ethical Standards: All procedures were performed in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its further amendments. The research project was approved by the Wrocław Medical University ethics committee (decision no. KB-786/2018).

References

1. Mamoulakis, C.; Tsarouhas, K.; Fragkiadoulaki, I.; Heretis, I.; Wilks, M.; Spandidos, D.; Tsitsimpikou, C.; Tsatsakis, A. Contrast-induced nephropathy: Basic concepts, pathophysiological implications and prevention strategies. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *180*, 99–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mamoulakis, C.; Fragkiadoulaki, I.; Karkala, P.; Georgiadis, G.; Zisis, I.E.; Stivaktakis, P.; Kalogeraki, A.; Tsiaoussis, T.; Burykina, T.; Lazopoulos, G.; et al. Contrast-induced nephropathy in an animal model: Evaluation of novel biomarkers in blood and tissue samples. *Toxicol. Rep.* **2019**, *6*, 395–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tsarouhas, K.; Tsitsimpikou, C.; Papantoni, X.; Lazaridou, D.; Koutouzis, M.; Mazzaris, S.; Rezaee, R.; Mamoulakis, C.; Georgoulas, P.; Nepka, C.; et al. Oxidative stress and kidney injury in trans-radial catheterization. *Biomed. Rep.* **2018**, *8*, 417–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chevalier, R.L. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: Role of the glomerulotubular junction. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2016**, *311*, F145–F161. [[CrossRef](#)]
5. Koh, K.N.; Sunkara, A.; Kang, G. Acute Kidney Injury in Pediatric Patients Receiving Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Incidence, Risk Factors, and Outcomes. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2018**, *24*, 758–764. [[CrossRef](#)]
6. Raina, R.; Herrera, N.; Krishnappa, V.; Sethi, S.K.; Deep, A.; Kao, W.; Bunchman, T.; Abu-Arja, R. Hematopoietic stem cell transplantation and acute kidney injury in children: A comprehensive review. *Pediatr. Transplant.* **2017**, *21*, e12935. [[CrossRef](#)]
7. Didsbury, M.S.; Mackie, F.E.; Kennedy, S.E. A systematic review of acute kidney injury in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr. Transplant.* **2015**, *19*, 460–470. [[CrossRef](#)]
8. Kizilbash, S.J.; Kashtan, C.E.; Chavers, B.M.; Cao, Q.; Smith, A.R. Acute kidney injury and the risk of mortality in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2016**, *22*, 1264–1270. [[CrossRef](#)]

9. Sutherland, S.M.; Byrnes, J.J.; Kothari, M.; Longhurst, C.A.; Dutta, S.; Garcia, P.; Goldstein, S.L. AKI in hospitalized children: Comparing the pRIFLE, AKIN, and KDIGO definitions. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *10*, 554–561. [[CrossRef](#)]
10. Haase, M.; Kellum, J.A.; Ronco, C. Subclinical AKI—An emerging syndrome with important consequences. *Nat. Rev. Nephrol.* **2012**, *8*, 735–739. [[CrossRef](#)]
11. Ronco, C.; Kellum, J.A.; Haase, M. Subclinical AKI is still AKI. *Crit. Care* **2012**, *16*, 313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Basu, R.K.; Wong, H.R.; Krawczeski, C.D.; Wheeler, D.S.; Manning, P.B.; Chawla, L.S.; Devarajan, P.; Goldstein, S.L. Combining functional and tubular damage biomarkers improves diagnostic precision for acute kidney injury after cardiac surgery. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, *64*, 2753–2762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Benoit, S.W.; Dixon, B.P.; Goldstein, S.L.; Bennett, M.R.; Lane, A.; Louder, D.T.; Rotz, S.J.; Gloude, N.J.; Lake, K.E.; Litts, B.; et al. A novel strategy for identifying early acute kidney injury in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2019**, *54*, 1453–1461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kanduri, S.R.; Cheungpasitporn, W.; Thongprayoon, C.; Bathini, T.; Kovvuru, K.; Garla, V.; Medaura, J.; Vaitla, P.; Kashani, K.B. Incidence and mortality of acute kidney injury in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A systematic review and meta-analysis. *QJM* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Caliskan, Y.; Basisik, S.K.; Sargin, D.; Ecder, T. Early renal injury after myeloablative allogeneic and autologous hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2006**, *38*, 141–147. [[CrossRef](#)]
16. Basu, R.K. Targeting acute kidney injury: Can an innovative approach to existing and novel biomarkers shift the paradigm? *Nephron* **2019**, *143*, 207–210. [[CrossRef](#)]
17. Chawla, L.S.; Bellomo, R.; Bihorac, A.; Goldstein, S.L.; Siew, E.D.; Bagshaw, S.M.; Bittleman, D.; Cruz, D.; Endre, Z.H.; Fitzgerald, R.L.; et al. Acute kidney disease and renal recovery: Consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 workgroup. *Nat. Rev. Nephrol.* **2017**, *13*, 241–257. [[CrossRef](#)]
18. Schwartz, G.J.; Muñoz, A.; Schneider, M.F.; Mak, R.H.; Kaskel, F.; Warady, B.A.; Furth, S.L. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 629–637. [[CrossRef](#)]
19. Cachat, F.; Combescure, C.; Cauderay, M.; Girardin, E.; Chehade, H. A systematic review of glomerular hyperfiltration assessment and definition in the medical literature. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *10*, 382–389. [[CrossRef](#)]
20. Iduoriyekemwen, N.J.; Ibadin, M.O.; Aikhionbare, H.A.; Idogun, S.E.; Abiodun, M.T. Glomerular hyperfiltration in excess weight adolescents. *Niger. J. Clin. Pract.* **2019**, *22*, 842–848. [[CrossRef](#)]
21. Zhou, W.; Guan, Q.; Kwan, C.C.H.; Chen, H.; Gleave, M.E.; Nguan, C.Y.C.; Du, C. Loss of clusterin expression worsens renal ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2010**, *298*, F568–F578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Guo, J.; Guan, Q.; Liu, X.; Wang, H.; Gleave, M.E.; Nguan, C.Y.C.; Du, C. Relationship of clusterin with renal inflammation and fibrosis after the recovery phase of ischemia-reperfusion injury. *BMC Nephrol.* **2016**, *17*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kim, S.S.; Song, S.H.; Kim, J.H.; Jeon, Y.K.; Kim, B.H.; Kang, M.-C.; Chun, S.W.; Hong, S.H.; Chung, M.; Kim, Y.K.; et al. Urine clusterin/apolipoprotein J is linked to tubular damage and renal outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Endocrinol.* **2017**, *87*, 156–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Watson, D.; Yang, J.; Sarwal, R.D.; Sigdel, T.K.; Liberto, J.; Damm, I.; Louie, V.; Sigdel, S.; Livingstone, D.; Soh, K.; et al. A novel multi-biomarker assay for non-invasive quantitative monitoring of kidney injury. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Da, Y.; Akalya, K.; Murali, T.; Vathsala, A.; Tan, C.-S.; Low, S.; Lim, H.-N.; Teo, B.-W.; Lau, T.; Ong, L.; et al. Serial quantification of urinary protein biomarkers to predict drug-induced acute kidney injury. *Curr. Drug Metab.* **2019**, *20*, 656–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Fazel, M.; Sarveazad, A.; Ali, K.M.; Yousefifard, M.; Hosseini, M. Accuracy of urine kidney injury molecule-1 in predicting acute kidney injury in children; a systematic review and meta-analysis. *Arch. Acad. Emerg. Med.* **2020**, *8*, e44. [[PubMed](#)]
27. Humphreys, B.D.; Xu, F.; Sabbisetti, V.; Grgic, I.; Naini, S.M.; Wang, N.; Chen, G.; Xiao, S.; Patel, D.; Henderson, J.M.; et al. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 4023–4035. [[CrossRef](#)]
28. Kwatra, N.S.; Meany, H.J.; Ghelani, S.J.; Zahavi, D.; Pandya, N.; Majd, M. Glomerular hyperfiltration in children with cancer: Prevalence and a hypothesis. *Pediatr. Radiol.* **2017**, *47*, 221–226. [[CrossRef](#)]

29. Filler, G.; Lee, M. Educational review: Measurement of GFR in special populations. *Pediatr. Nephrol.* **2018**, *33*, 2037–2046. [[CrossRef](#)]
30. Young, J.; Dahale, D.; Demmel, K.; O'Brien, M.; Geller, J.I.; Courter, J.; Haslam, D.B.; Danziger-Isakov, L.; Goldstein, S.L. Reducing acute kidney injury in pediatric oncology patients: An improvement project targeting nephrotoxic medications. *Pediatr. Blood Cancer* **2020**, *67*, e28396. [[CrossRef](#)]
31. Georgiadis, G.; Zisis, I.-E.; Docea, A.O.; Tsarouhas, K.; Fragkiadoulaki, I.; Mavridis, C.; Karavitakis, M.; Stratakis, S.; Stylianou, K.; Tsitsimpikou, C.; et al. Current concepts on the reno-protective effects of phosphodiesterase 5 inhibitors in acute kidney injury: Systematic search and review. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Iordache, A.M.; Buga, A.M.; Albuiescu, D.; Vasile, R.C.; Mitrut, R.; Georgiadis, G.; Zisis, I.-E.; Mamoulakis, C.; Tsatsakis, A.; Docea, A.O.; et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors ameliorate structural kidney damage in a rat model of contrast-induced nephropathy. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *143*, 111535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Nakhjavan-Shahraki, B.; Yousefifard, M.; Ataei, N.; Baikpour, M.; Ataei, F.; Bazargani, B.; Abbasi, A.; Ghelichkhani, P.; Javidilarijani, F.; Hosseini, M. Accuracy of cystatin C in prediction of acute kidney injury in children; serum or urine levels: Which one works better? A systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol.* **2017**, *18*, 120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Wrocław, 25.02.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Kinga Musiał
Katedra i Klinika Nefrologii Pediatricznej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Monika Augustynowicz, Agnieszka Bargenda-Lange, Krzysztof Kałwak, Danuta Zwolińska, **Kinga Musiał**
Markers of acute kidney injury in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Adv.Clin.Exp.Med. 2019 Vol.28 no.8 s.1111-1118.
- Monika Augustynowicz, Krzysztof Kałwak, Danuta Zwolińska, **Kinga Musiał**
The incidence of acute kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. Adv.Clin.Exp.Med. 2021 Vol.30 no.1 s.87-92.
- **Kinga Musiał**, Monika Augustynowicz, Izabella Miśkiewicz-Migoń, Krzysztof Kałwak, Marek Ussowicz, Danuta Zwolińska
Clusterin as a new marker of kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - a pilot study. J.Clin.Med. 2020 Vol.9 no.8 art.2599.

mój udział obejmował:

- nadzór merytoryczny i kierowanie projektem naukowym,
- pomoc w opracowaniu koncepcji i założeń naukowych,
- pomoc w zaplanowaniu i przeprowadzeniu badań,
- pomoc w interpretacji wyników,
- pomoc w pisaniu manuskryptu


Podpis

Wrocław, 25.02.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Kałwak
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Monika Augustynowicz, Agnieszka Bargenda-Lange, **Krzysztof Kałwak**, Danuta Zwolińska, Kinga Musiał
Markers of acute kidney injury in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Adv.Clin.Exp.Med. 2019 Vol.28 no.8 s.1111-1118.
- Monika Augustynowicz, **Krzysztof Kałwak**, Danuta Zwolińska, Kinga Musiał
The incidence of acute kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. Adv.Clin.Exp.Med. 2021 Vol.30 no.1 s.87-92.
- Kinga Musiał, Monika Augustynowicz, Izabella Miśkiewicz-Migoń, **Krzysztof Kałwak**, Marek Ussowicz, Danuta Zwolińska
Clusterin as a new marker of kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - a pilot study. J.Clin.Med. 2020 Vol.9 no.8 art.2599.

mój udział polegał na:

- nadzorce merytorycznym,
- pomocy w organizowaniu finansowania badań

Podpis



Wrocław, 25.02.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Danuta Zwolińska
Katedra i Klinika Nefrologii Pediatricznej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Monika Augustynowicz, Agnieszka Bargenda-Lange, Krzysztof Kałwak, **Danuta Zwolińska**, Kinga Musiał
Markers of acute kidney injury in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Adv.Clin.Exp.Med. 2019 Vol.28 no.8 s.1111-1118.
- Monika Augustynowicz, Krzysztof Kałwak, **Danuta Zwolińska**, Kinga Musiał
The incidence of acute kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. Adv.Clin.Exp.Med. 2021 Vol.30 no.1 s.87-92.
- Kinga Musiał, Monika Augustynowicz, Izabella Miśkiewicz-Migoń, Krzysztof Kałwak, Marek Ussowicz, **Danuta Zwolińska**
Clusterin as a new marker of kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - a pilot study. J.Clin.Med. 2020 Vol.9 no.8 art.2599.

mój udział polegał na:

- wspieraniu merytorycznym,
- pomocy w organizowaniu finansowania badań



Podpis

Wrocław, 25.02.2022 r.

Dr hab. Marek Ussowicz, prof. UMW
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Kinga Musiał, Monika Augustynowicz, Izabella Miśkiewicz-Migoń, Krzysztof Kałwak, **Marek Ussowicz**, Danuta Zwolińska
Clusterin as a new marker of kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - a pilot study. J.Clin.Med. 2020 Vol.9 no.8 art.2599.

mój udział polegał na:

- wspieraniu merytorycznym,
- rekrutacji pacjentów i zabezpieczeniu materiału do badania

Podpis


Dr hab. n. med. Marek Ussowicz, prof. UMW
Specjalista pediatrii,
transplantologii klinicznej,
onkologii i hematologii dziecięcej
5458206

Wrocław, 25.02.2022 r.

Lek. Izabella Miśkiewicz-Migoń
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Kinga Musiał, Monika Augustynowicz, **Izabella Miśkiewicz-Migoń**, Krzysztof Kałwak, Marek Ussowicz, Danuta Zwolińska
Clusterin as a new marker of kidney injury in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - a pilot study. J.Clin.Med. 2020 Vol.9 no.8 art.2599.

mój udział polegał na:

-rekrutacji pacjentów i zabezpieczeniu materiału do badania

Podpis

Izabella Miśkiewicz-Migoń

Dr n. med. Agnieszka Bargenda-Lange
Katedra i Klinika Nefrologii Pediatrycznej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław, 25.02.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Monika Augustynowicz, **Agnieszka Bargenda-Lange**, Krzysztof Kałwak, Danuta Zwolińska, Kinga Musiał
Markers of acute kidney injury in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation.
Adv.Clin.Exp.Med. 2019 Vol.28 no.8 s.1111-1118.

mój udział polegał na:

-pomocy w przygotowaniu tekstu publikacji

Podpis

