

mgr Natasza Olszowska-Zaremba

**„Rola oceny swoistości przeciwciał anti-HLA
w analizie ryzyka immunologicznego u
potencjalnych biorców alloprzeszczepu
nerki”**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: Dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon

Promotor: Dr hab. n. med. Jolanta Gozdowska

Zakład Immunologii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Streszczenie w języku polskim

Oznaczenie przeciwciał anty-HLA (human leukocyte antigens) techniką fazy stałej z wykorzystaniem mikrokulek SAB (single antigen beads) stanowi najbardziej czułą i swoistą metodę oceny zimmunizowania potencjalnych biorców nerki. Ponadto, umożliwia wykonanie wirtualnej próby krzyżowej (VXM – virtual crossmatch), która stanowi ważny element oceny ryzyka immunologicznego przed przeszczepieniem. Z wykorzystaniem VXM związanych jest jednak kilka kontrowersyjnych kwestii. Jedną z nich jest znaczenie kliniczne przeciwciał swoistych dla dawcy (DSA – donor-specific antibody), wykrytych wyłącznie metodą SAB. Drugim zagadnieniem spornym jest korelacja pomiędzy wynikami VXM a wynikami prób krzyżowych biologicznych (PXM – physical crossmatch), wykonywanych rutynowo przed transplantacją. Poniższa dysertacja podejmuje temat obydwu wymienionych kwestii w kontekście doświadczeń jednego ośrodka transplantacyjnego (Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus w Warszawie) oraz bieżących zasad alokacji biorców nerki obowiązujących w Polsce.

Celem pierwszej części pracy było zbadanie zdolności pojedynczych DSA oznaczonych metodą SAB do prognozowania wyników próby krzyżowej metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC-XM – complement-dependent cytotoxicity crossmatch) oraz próby krzyżowej metodą cytometrii przepływowej (FLXM – flow cytometry crossmatch). W ramach realizacji projektu wykonano 261 CDC-XM oraz 180 FLXM w grupie potencjalnych biorców nerki posiadających pojedyncze przeciwciała anty-HLA -A, lub -B, lub -DR swoiste dla potencjalnych dawców zmarłych. Zdolność prognozowania wyników PXM oceniono na podstawie analizy ROC (receiver operating characteristics) w oparciu o wyniki anty-HLA SAB z okresu czterech miesięcy, które były zebrane przed i po wykonaniu PXM. Wyznaczono optymalne punkty odcięcia DSA MFI oraz wskaźniki wiarygodności (LR – likelihood ratio). Wpływ dostępności wyników anty-HLA SAB na wartość prognostyczną VXM został oceniony poprzez porównanie krzywych ROC. Ewaluacji poddano również kinetykę zmian poziomu DSA pomiędzy dostępnymi oznaczeniami anty-HLA SAB.

Wykazano, że zdolność pojedynczych DSA HLA -A, -B, -DR do prognozowania wyniku CDC-XM była mniejsza niż w przypadku FLXM. Przewidywanie wyniku FLXM odbywało się z dobrą dokładnością i wymagało niskiego punktu odcięcia MFI (mean fluorescence intensity) DSA (około 6000). Natomiast prognozowanie wyniku CDC-XM odznaczało się niską dokładnością przy wysokiej wartości optymalnego punktu odcięcia (około

10 000 MFI). Kwartalna aktualizacja wyników anty-HLA SAB po wykonaniu PXM nie spowodowała istotnej poprawy prognozyki VXM w badanej grupie biorców.

Przyczyną zaobserwowanych różnic w jakości prognozyki FLXM i CDC-XM z wykorzystaniem pojedynczych DSA mogą być różnice w metodologii i czułości analizowanych metod prób krzyżowych. W celu poprawy zdolności VXM do prognozowania wyników PXM można rozważyć następujące rozwiązania: zwiększenie czułości CDC-XM, wprowadzenie systematycznej aktualizacji wyników anty-HLA SAB w oparciu o dane z systemu monitorowania zdarzeń immunizujących, rozszerzenie zakresu typowania antygenów HLA u potencjalnych dawców oraz inkorporację procedur eliminujących czynniki interferujące w oznaczenia anty-HLA SAB.

Druga część projektu skupiona była wokół analizy znaczenia klinicznego niskich poziomów DSA w kohorcie biorców nerki od dawcy żywego. W badaniu uwzględniono zarówno pre-transplantacyjne DSA o swoistości HLA –A, –B i –DR <5000 MFI, która to wartość stanowi punkt odcięcia VXM w Polsce, jak i DSA HLA –DQ, –DP, –Cw, które nie były rutynowo typowane u dawców w momencie trwania badania. Ponadto, w oparciu o dostępne wyniki oznaczenia anty-HLA SAB z okresu po transplantacji, w badanej kohorcie sprawdzono częstość występowania *de novo* DSA oraz pre-transplantacyjnych DSA wykazujących tendencję do utrzymywania się po przeszczepieniu.

Z historycznej kohorty biorców, którzy otrzymali przeszczep nerki od dawcy żywego w latach 2014-2018 w naszym ośrodku transplantacyjnym, wybrano grupę 55 pacjentów stosując następujące kryteria włączenia: wiek >18 lat, dawca niebędący HLA-identycznym rodzeństwem, brak terapii odczulającej, dostępny wynik oznaczenia anty-HLA SAB z okresu przed przeszczepieniem oraz negatywne wyniki CDC-XM i FLXM. W zależności od wykrytych reaktywności DSA u biorców, wykonano uzupełniające typowanie HLA –DQ, –DP lub –Cw dawców. W celu oceny wyników transplantacji pacjentów podzielono na trzy grupy: DSA pozytywnych, posiadających przeciwciała anty-HLA niebędące DSA (NDSA – non-donor specific antibody) oraz biorców, u których nie wykazano obecności żadnych przeciwciał anty-HLA (grupa negatywna). Okres obserwacji wynosił trzy lata.

W badanej kohorcie wykazano obecność niskich pre-transplantacyjnych DSA u 33% pacjentów. Znakomita większość (78%) zaobserwowanych DSA była o swoistości HLA –DQ, –DP oraz –Cw, z których najwyższe MFI wyniosło 5767 dla DSA DQ2, a najniższe przybrało

wartość 319MFI dla DSA DP4. Spośród reaktywności DSA HLA –A, –B, –DR najwyższą wartość MFI (2191) osiągnęły DSA DR52.

Obecność niskich pre-transplantacyjnych DSA nie wpłynęła na wielkość przesączania kłębuszkowego wyrażonego wartością eGFR (estimated glomerular filtration rate) ani na częstość występowania proteinurii u biorców. Przeżywalność przeszczepu w grupie DSA wyniosła 94,4% i była w sposób nieistotny niższa ($p=0.7$) w stosunku do grup NDSA (100%) i negatywnej (100%). W 3-letnim okresie obserwacji nie odnotowano w kohorcie żadnego przypadku ostrego odrzucania zależnego od przeciwciał potwierdzonego biopsją, co przemawia za tym, że pacjenci posiadający niskie DSA nie są narażeni na częstsze występowanie epizodów ostrego odrzucania. W grupie DSA-pozytywnych pacjentów odnotowano jednak tendencję do częstszego występowania przeciwciał *de novo* DSA oraz złogów C4d w kapilarach około cewkowych (PTC – peritubular capillaries).

Wyniki uzyskane w obecnym projekcie mogą w istotny sposób przyczynić się do skutecznego wykorzystania informacji wynikających z oceny DSA w transplantologii nefrologicznej. Ze względu na ograniczenia badania, w tym niską liczebność badanej kohorty, w celu wyjaśnienia poczynionych obserwacji, niezbędne są dalsze badania z udziałem większej grupy biorców w dłuższym okresie obserwacji.