

Łódź, 20.07.2023

**Prof. dr hab. n. med. Iłona Kurnatowska**

Klinika Chorób Wewnętrznych i Nefrologii Transplantacyjnej

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

*ilona.kurnatowska@umed.lodz.pl*

## **RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ**

**Lek. Agnieszki Urzykowskiej**

***„Ocena skuteczności trójlekowego schematu immunosupresji  
w zapobieganiu wytwarzania swoistych przeciwciał anty-HLA  
(ang. donor-specific antibodies; DSA) u dzieci po transplantacji nerki-  
badanie retrospektywne i prospektywne”***

**Promotor: Prof. dr hab. n. med. Ryszard Grenda**

Praca powstała w Klinice Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia  
Tętniczego z wykorzystaniem grantu IPCZD nr S150

Przeszczepianie nerek jest najskuteczniejszą metodą leczenia nerkozastępczego, pozwalającą na dłuższe przeżycie i lepszą jakość życia wszystkich chorych ze schyłkową niewydolnością nerek, a szczególnie dzieci. Dzięki coraz doskonalszym metodom chirurgicznym oraz terapii immunosupresyjnej znacznie poprawia się wczesne przeżycie nerki przeszczepionej, w mniejszym stopniu również przeżycie długoterminowe. Na wyniki wczesne jak i długoterminową czynność nerki przeszczepionej wpływ ma wiele czynników zarówno tych immunologicznych jak i niezwiązanych z układem odpornościowym. Za pogorszenie czynności przeszczepu, a w konsekwencji jego utratę w dużej mierze odpowiada proces przewlekłego odrzucania, w który zaangażowane są przeciwciała przeciwko antygenom dawcy (DSA), zarówno te obecne przed przeszczepieniem jak i te powstałe *de novo* (dnDSA). Zagadnieniom obecności, powstawania *de novo* DSA oraz czynnikom wpływającym na ten proces, i.in. powiązaniem z „siłą” immunosupresji mierzoną różnymi wykładnikami u pediatrycznych biorców nerki jest poświęcona przedmiotowa mi do recenzji praca lek Agnieszki Urzykowskiej.

Praca liczy 108 stron, w tym 29 tabel oraz 13 rycin i ma układ typowy dla prac na stopień naukowy doktora. Na początku Autorka zamieszcza spis treści oraz wyjaśnienie stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i odpowiadające mu w języku angielskim. Wyodrębnione rozdziały to Wstęp, Cele pracy, Materiał i metody, Wyniki wraz z ich podsumowaniem oraz Dyskusja. Do pracy załączony został również potwierdzający autentyczność uzyskanych wyników spis tabel (nr 24-29) zawierających dane źródłowe, w tym wyniki laboratoryjne pacjentów zakwalifikowanych do badania. Na końcu pracy umieszczono 141 pozycji trafnie dobranego i aktualnego piśmiennictwa. Brak jest zazwyczaj umieszczanego w dysertacjach spisu tytułów zamieszczonych tabel i rycin.

We wstępie Doktorantka omawia procedurę przeszczepienia nerki (KTx) jako najlepszą metodę leczenia nerkozastępczego, wymienia wskazania wraz z najczęstszymi przyczynami ESKD u dzieci. Przytacza dane co do przeżycia zarówno nerek jak i biorców po KTx oraz różne czynniki, które na to przeżycie mają wpływ, w tym czynniki immunologiczne. Czyni to na podstawie dobrze dobranego i aktualnego piśmiennictwa. Przy wymienianiu przez Autorkę przyczyn zgonów biorców przeszczepu wskazany byłby podział na okres wczesny i późny po zabiegu, gdyż przyczyny te różnią się w zależności od okresu po KTx.



Największa część wstępu poświęcona jest i słusznie, biorąc pod uwagę temat rozprawy, czynnikom immunologicznym mającym wpływ na przeżycie przeszczepu w tym również doborowi schematu immunosupresji w zależności od ryzyka immunologicznego biorcy. Zwraca Koleżanka uwagę na jedną z podstawowych przyczyn niepowodzenia przeszczepu jakim jest przewlekłe odrzucanie humoralne (cAMR) oraz udział w tym procesie swoistych przeciwciał przeciwko antygenom zgodności tkankowej dawcy (*Human Leucocyte Antigen*; HLA) (ang. *Donor Specific Antibodies*; DSA), omawiając ich rodzaje oraz czynniki ryzyka ich wytworzenia. Na rycinach 1a,b prezentuje w przejrzysty sposób zasady testu Luminex, w którym te przeciwciała się wykrywa oraz omawia zasady tego testu w tekście rozprawy. Doktorantka bardzo wnikliwie opisuje patogenezę powstawania przeciwciał zarówno preformowanych jak i tych powstałych *de novo*, poświęcając cały podrozdział wpływowi leczenia immunosupresyjnego na odpowiedź immunologiczną. Cały wstęp napisany jest bardzo ciekawie, przejrzysto. Zawiera przegląd aktualnego i dobrze dobrane tematycznie piśmiennictwa poświęconego odpowiedzi immunologicznej w postaci tworzenia się przeciwciał przeciwko antygenom dawcy oraz czynnikom mającym wpływ na ten proces m.in. wpływowi siły immunosupresji. Wstęp stanowi bardzo dobre podłoże do sformułowania założeń i celów pracy.

Zwieńczeniem „Wstępu” jest podrozdział w którym Autorka formułuje hipotezę badawczą, prezentuje uzasadnienie i cele pracy. Doktoranta w materiale naukowym przedstawionym mi do oceny podjęła się próby dokonania oceny retro- i prospektywnej częstości występowania DSA, w zależności od wskazań do wykonania tego badania (grupa retrospektywna), od czasu po transplantacji, oceny wpływu DSA na losy przeszczepu w perspektywie prospektywnej oraz –oceny skuteczności podstawowej immunosupresji w zakresie zapobiegania powstawaniu dnDSA u dziecięcych biorców przeszczepu nerki niskiego i umiarkowanego ryzyka immunologicznego. Badania wykonała w oparciu o pacjentów własnego ośrodka transplantacyjnego Kliniki Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego IPCZD.

Cele pracy są sformułowane trafnie i zachęcają klinicystę do dokładnego przeanalizowania poczynionych obserwacji.

Postawione sobie cele, metody ich realizacji oraz wyniki przeprowadzonych badań i ich analizę zostały już częściowo opublikowane w pracy, w której Doktorantka jest pierwszym

autorem, a która ukazała się w renomowanym piśmie o zasięgu międzynarodowym z dużym wskaźnikiem oddziaływania:

1. Urzykowska A, Piątosza B, Grycuk U, Kowalewski G, Kułaga Z, Grenda R.  
Evaluation of Cumulative Effect of Standard Triple Immunosuppression on Prevention of De Novo Donor Specific Antibodies (dnDSA) Production in Children after Kidney Transplantation-A Retrospective and Prospective Study. *Children* (Basel). 2021 Dec 9;8(12):1162. doi: 10.3390/children8121162. PMID: 34943360; PMCID: PMC8700537. IF 2.835.

Praca przeszła przez recenzję i opinie międzynarodowych ekspertów, co świadczy o jej dużej wartości naukowej.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera informacje dotyczące metod badawczych użytych w pracy. Przedstawia dokładnie kryteria doboru grupy badanej. Badania przeprowadzono wśród dużej jak na pediatryczną grupę 67 dzieci po przeszczepieniu Kliniki Nefrologii Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego w Instytucie Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka. Doktorantka formułując ścisłe kryteria wybrała do badania jednorodną grupę biorców, gdyż wszystkie dzieci wykazywały się niskim lub umiarkowanym ryzykiem immunologicznym oraz stosowano u nich ten sam schemat trójlekowej immunosupresji. Badania przeprowadzono w dwóch grupach: retrospektywnej, do której zakwalifikowała 29 dzieci u których stwierdzano obecność DSA w dowolnym czasie po KTx, a badanie to wykonywano ze wskazań, z medianą obserwacji wynoszącą osiem lat oraz grupę prospektywną (n=38), obserwowaną przez około 2 lata, w której protokół badania obejmował 5-krotnie oznaczanie przeciwciał.

W rozdziale „Materiał i Metody” Doktorantka bardzo precyzyjnie określa kryteria włączenia i wykluczające z badania. W celu ułatwienia prześledzenia protokołu badania Autorka na Ryc 3. przedstawia klarowny flowchart przebiegu badania. Warto może byłoby zawrzeć informację ilu biorców otrzymało nerkę od dawcy żywego, a ilu od dawcy zmarłego i czy istniała różnica w częstości występowania przeciwciał dnDSA u chorych w zależności od tego od jakiego dawcy pochodził narząd. Trzeba podkreślić duży zakres analizowanych przez Autorkę danych obejmujący parametry antropometryczne, chorobę podstawową, liczbę niezgodności antygenowych, wartość PRA; czynność nerki przeszczepionej, oznaczenia stężeń leków w licznych punktach czasowych, analizę zmienności stężenia TAC tak istotną zwłaszcza w kontekście zachowania *compliance*,

szczególnie przez dzieci i młodzież oraz zastosowanie oceny ogólnej siły immunosupresji z wykorzystaniem wskaźnika Vasudeva, a obecnością przeciwciał DSA. Trzeba podkreślić że próba ocena ogólnej siły immunosupresji jest nowatorską w kontekście występowania przeciwciał DSA. Analizie poddano również wyniki biopsji wykonywanych ze wskazań klinicznych.

Wyniki tej wielokierunkowej analizy statystycznej zostały opisane szczegółowo, i precyzyjnie przedstawione w postaci przejrzyste skonstruowanych tabel i rycin, do których Autorka zamieszcza jasną interpretację. Do ich opracowania użyto dobrze dobranych narzędzi statystycznych, opisanych w metodyce. Wszystkie przeprowadzone analizy oraz uzyskane wyniki są bardzo interesujące. Z punktu widzenia klinicznego bardzo istotne jest zwrócenie uwagi i próba oszacowania prawdopodobieństwa wystąpienia odrzucania humoralnego poprzez obliczenie wskaźnika RIS-DSA. Podkreślić należy ogrom pracy włożony w przeprowadzenie licznych analiz oraz umiejętność przedstawienia wyników tych analiz. Wyniki tych analiz mają implikacje kliniczne nie tylko w postaci ogólnych obserwacji do wykorzystania w przyszłości, ale również tu i teraz u indywidualnych chorych. Doktorantka podchodzi bardzo krytycznie i rozsądnie do swoich wyników, podkreśla, że ze względu na różne kryterium przynależności do grupy retrospektywnej (ocena dnDSA tylko ze wskazań klinicznych) i prospektywnej (ocena dnDSA przesiewowa, niezależnie od stanu klinicznego) bezpośrednie porównanie niektórych parametrów nie było możliwe.

Bardzo istotną obserwacją, dokonaną na podstawie oceny zmienności wskaźnika Vasudeva jest fakt że u pacjentów którzy nie wytworzyli przeciwciał rzadziej dochodziło do zmian dawkowania leków immunosupresyjnych (wykazywali się oni bardziej stabilnymi stężeniami leków w surowicy).

Z klinicznej ciekawości, ale i myśląc o potencjalnym wpływie stosowanego leczenia immunosupresyjnego na formowanie się przeciwciał chciałabym dowiedzieć się:

1. Po ilu tygodniach po KTx osiągnano dawkę minimalną steroidów?
2. Jakie były wskazania do stosowania sirolimusu u pacjentów w grupie retrospektywnej (7 chorych - dość spora grupa, a u żadnego z grupy prospektywnej). W jakich schematach lek był stosowany z MMF czy z TAC?
3. Czy częściej w grupie z sirolimusem obecne było odrzucanie?



W dyskusji Doktorantka przekonuje i uzasadnia konieczność przeprowadzenia swojego badania, pomimo dość bogatego piśmiennictwa dotyczącego znaczenia DSA. Słusznie twierdząc, że niezależnie od ogólnie przyjętych zasad leczenia immunosupresyjnego i powszechnego ich stosowania, część chorych wykazuje dobre odległe rokowanie i długo utrzymuje czynność przeszczepionej nerki, a u pozostałych, mimo stosowania podobnego schematu leków – rozwijają się dnDSA i ujawniają się odległe skutki ich obecności. Stąd podjęty przez lek Agnieszkę Urzykowską temat badań i założone cele są bardzo istotne z klinicznego i naukowego punktu widzenia, zaś sformułowane na podstawie przeprowadzonego badania wnioski mają istotną implikację kliniczną i odpowiadają postawionym celom. Należy podkreślić, że dyskusja dotycząca w głównej mierze immunologicznych aspektów procesów odrzucania, tworzenia i udziału w tym procesie różnych rodzajów przeciwciał przeciwko antygenom dawcy, zarówno anty-HLA, ale i tych nie związanych z układem HLA, a także wpływowi „siły” immunosupresji na wytwarzanie tych przeciwciał napisana jest bardzo dobrze, zwiera wiele cennych przemyśleń Autorki, co świadczy o jej dojrzałości zarówno naukowej jak i klinicznej. Trudne zagadnienia przedstawione są w sposób jasny i zrozumiały, czyta się ten rozdział z wielką ciekawością i przyjemnością. Autorka przedstawia wyniki swoich badań na tle wyników innych badaczy w sposób umiejętny je analizując i wyciągając wnioski. Tak przejrzyste przedstawienie zawitych meandrów immunologii świadczy o tym, że Doktorantka świetnie w temacie się orientuje i styka się na co dzień z problemami dzieci po przeszczepieniu nerki. W dyskusji podejmuje Autorka kilka wątków, między innymi bardzo zręcznie opisuje zmieniające się dzięki postępowi oceny immunologicznej poglądy na przyczynę pogarszającej się czynności grafu i wyeliminowanie poglądu, że to nefrotoksyczność inhibitorów kalcyneuryny jest jej przyczyną, na rzecz przewlekłego odrzucania z udziałem w tym procesie przeciwciał przeciwko antygenom dawcy. Doktorantka przeprowadza nas jak po nitce przez trudne zagadnienia występowania różnych rodzajów przeciwciał DSA, znaczenia klinicznego zarówno ich rodzaju jak i "siły" wyrażonej wartością MFI, zdolności wiązania dopełniacza, czasu po przeszczepieniu, występowania epizodów ostrego i przewlekłego odrzucania. Cenną obserwacją, a w zasadzie zaleceniem, które formułuje Koleżanka jest to, że wykrycie dnDSA nawet o niskim MFI jest wskazaniem do regularnego ich monitorowania, pomimo, że powszechnie panuje przekonanie, że  $MFI < 2500$  nie jest związane z dużym ryzykiem immunologicznym. Rozprawia się również Doktorantka z zaleceniem wykonywania biopsji



protokolarnych – wykazując, na podstawie analizy piśmiennictwa, iż w większości przypadków ich wyniki nie przynoszą zmiany leczenia, ani też nie wpływają zasadniczo na poprawę czynności przeszczepu. Oczywiście w przeciwieństwie do biopsji wykonywanych ze wskazań klinicznych. Praca lek. Agnieszki Urzykowskiej jest pionierską w zakresie określenia skumulowanej siły immunosupresji wyliczonej określoną wskaźnikiem Vasudeva, a obecnością przeciwciał DSA. Jak słusznie Doktorantka zauważa, nie opublikowano do tej pory takich badań. Formułuje także przesłanki co do konieczności oznaczania przeciwciał non-HLA u biorców przeszczepu, które często współistnieją z dnDSA i korelują z odległym obniżaniem eGFR, nie wyrażając się w postaci jawnego klinicznie odrzucania humoralnego. Podkreśla Koleżanka, że są to wskazówki formułowane jedynie na podstawie piśmiennictwa, gdyż takie przeciwciała nie były oznaczane w jej materiale badawczym. O dojrzałości naukowej i krytycznym spojrzeniu na swoje badania świadczy świadomość ograniczeń przeprowadzonego badania, które to ograniczenia Doktorantka wypunktowuje.

Na koniec dyskusji Autorka zamieszcza trzy najważniejsze w postępowaniu z pediatrycznymi biorcami przesłanki kliniczne wynikające z przeprowadzonych przez nią badań. Przesłanki te jednak z powodzeniem, zdaniem Recenzentki, można inkorporować na całą populację pacjentów po przeszczepieniu nerki, niezależnie od wieku. Czytając pracę nasuwa mi się pytanie do Doktorantki:

- Czy i jakie widziałaby możliwości, sposoby zapobiegania postępowi niewydolności przeszczepu i/lub wystąpienia odrzucania u chorych, u których stwierdza się dnDSA bez manifestacji klinicznej.

Podsumowując, dysertacja przygotowana jest wzorcowo, zawiera wszystkie elementy typowe dla standardowych prac doktorskich. Podkreślić należy wartość kliniczną przedstawionego materiału, zwłaszcza że wyniki i przedstawione analizy można implementować na codzienną praktykę kliniczną. Stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Agnieszki Urzykowskiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)” wymagane na stopień doktora nauk medycznych. Doktorantka podjęła ważny z punktu widzenia naukowego ale i klinicznego temat badawczy, sformułowała interesujące cele pracy, zastosowała właściwe metody umożliwiające ich realizację oraz wykazała umiejętność wszechstronnej analizy uzyskanych wyników w świetle aktualnej wiedzy i właściwego wnioskowania.

Przedstawiam zatem, Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie wniosek o dopuszczenie lek. Agnieszki Urzykowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc ponadto pod uwagę staranność i wszechstronność analizy bardzo szerokiego materiału badawczego, wartość naukową podjętego tematu oraz istotne implikacje kliniczne uzyskanych wyników, z wielką przyjemnością i przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie pracy.

*Ilona Kuciołowa*

*nk*