



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA I KLINIKA NEFROLOGII, TRANSPLANTOLOGII
I CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH

Kierownik Katedry i Kliniki – Prof. dr hab. n. med. Andrzej Oko

Szpital Kliniczny im. H. Święcickiego
ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. (+48 61) 867 19 61, 869 13 26
fax (+48 61) 869 16 88
e-mail: aoko@ump.edu.pl

Poznań, 2023-08-08

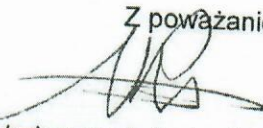
Pan
Prof. dr hab. n. med. Marcin Roszkowski
Zastępca Przewodniczącego Rady Naukowej
Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
W Warszawie

Al. Dzieci Polskich
04-730 Warszawa

Szanowny Panie Profesorze,

W załączeniu przesyłam ocenę rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. Agnieszki Urzykowskiej z Kliniki Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie pt. „Ocena skuteczności trójlekowego schematu immunosupresji w zapobieganiu wytwarzania swoistych przeciwciał anti-HLA”

Z poważaniem

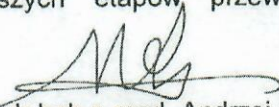

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Oko

przesączenia kłębuszkowego o ponad 30% od wartości wyjściowej, niezależnie od nieobecności humoralnego odrzucania.

3. W zakresie oceny siły immunosupresji:

- wykazano, że przeciwciała dnDSA nie występowały u chorych, u których mediana stężenia takrolimusu (TAC C₀) wyliczona z oznaczeń wykonanych w okresie dwuletniej obserwacji lub (odpowiednio) dwóch lat poprzedzających pojawienie się dnDSA, była ≥ 7.4 ng/ml;
- nie wykazano istotnej różnicy w zakresie wartości współczynnika zmienności stężenia takrolimusu (TAC C₀) między pacjentami produkującymi i nie produkującymi przeciwciała dnDSA;
- nie wykazano związku występowania/niewystępowania przeciwciał dnDSA z wartością wskaźnika skumulowanej siły trójlekowej immunosupresji (wg Vasudeva), co wskazuje, że podstawowym lekiem wpływającym na zahamowanie powstawania dnDSA jest takrolimus, pod warunkiem utrzymywania jego stężenia na odpowiedniej wysokości.

W podsumowaniu wyrażam opinię, że rozprawa doktorska lek. Agnieszki Urzykowskiej pt. „Ocena skuteczności trójlekowego schematu immunosupresji w zapobieganiu wytwarzania swoistych przeciwciał anty-HLA” spełnia warunki zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wyniki pracy zostały częściowo opublikowane w postaci artykułu oryginalnego w czasopiśmie Children (Basel) 2021;8(12):1162. doi: 10.3390/children8121162. Autorka wykazała się rozległą wiedzą w odniesieniu do zagadnień transplantologii klinicznej, zwłaszcza w aspekcie profilaktycznej immunosupresji. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dowodzi Jej umiejętności przedstawienia problemu naukowego i stanowi oryginalne jego rozwiązanie. Zasadniczą i wysoką wartością rozprawy jest udokumentowanie celowości prospektywnej oceny występowania dnDSA u biorców przeszczepu nerki poddanych terapii trójlekowej dla zapobiegania rozwojowi cAMB. Badanie to powinno stanowić standard postępowania w monitorowaniu czynności przeszczepionej nerki. Niniejszym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie o dopuszczenie lek. Agnieszki Urzykowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy.


Prof. dr hab.n.med. Andrzej Oko

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. Agnieszki Urzykowskiej z Kliniki Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie pt. „Ocena skuteczności trójlekowego schematu immunosupresji w zapobieganiu wytwarzania swoistych przeciwciał anti-HLA”

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

Ostatnie dwie dekady ubiegłego wieku zapisały się w historii transplantologii klinicznej znaczącą poprawą wyników przeszczepiania narządów litych, w tym nerek. Główną przyczyną wydłużenia czasu przeżycia przeszczepu nerki było wprowadzenie do praktyki klinicznej inhibitora kalcyneuryny – cyklosporyny A. Dalszy postęp wynikał z zastosowania silniejszego immunosupresyjnie leku takrolimusu w miejsce cyklosporyny i mykofenolanu mofetylu w miejsce azatiopryny. Aktualnie najbardziej rozpowszechnionym schematem immunosupresji potransplantacyjnej jest terapii trójlekowa oparta na takrolimusicie, mykofenolanie mofetylu i glikokortykosteroidach, uzupełniona w wybranych przypadkach indukcją przeciwciałami mono – lub poliklonalnymi. Takie postępowanie wybitnie poprawiło wczesne wyniki przeszczepiania nerek, a tzw, czas półtrwania przeszczepu nerki wydłużył się obecnie do 12-14 lat. . Tym niemniej, około 5% przeszczepów nerek rocznie jest traconych na skutek przewlekłej nefropatii graftu. To nie do końca trafne i akceptowane określenie wynika z patologicznych procesów toczących się w przeszczepionym narządzie, które mają charakter immunologiczny i nieimmunologiczny. Badania ostatnich lat wskazują, że przypisywania e istotnego znaczenia w uszkodzeniu narządu przewlekłej nefrotoksyczności inhibitorów kalcyneuryny było zbyt wygórowane, a większość przypadków dysfunkcji i następowej utraty czynności przeszczepionej nerki należy przypisać przewlekłemu odrzucaniu humoralnemu (cAMR). Rozpoznanie tego procesu opiera się w praktyce na wykrywaniu w krążeniu biorcy graftu swoistych przeciwciał przeciwko antygenom zgodności tkankowej dawcy (ang. *Donor Specific Antibodies*; dnDSA), obecności których nie stwierdzano przed zabiegiem. W badaniu biopsyjnym graftu stwierdza się zwykle wówczas obecność złożeń C4d składowej dopełniacza, co świadczy o

udziale aktywacji przez przeciwciała tego układu w uszkodzeniu przeszczepu. Przyczyną tego stanu może być nieadekwatna (zbyt słaba) immunosupresja wynikająca ze zbyt niskiego dawkowania leków, a niekiedy z zaniechania ich pobierania przez biorcę. Badania w kierunku rozpoznania cAMR wykonuje się niestety najczęściej dopiero przy stwierdzeniu dysfunkcji graftu, gdy proces destrukcyjny jest już wyraźnie zaznaczony, innymi słowy poszukiwanie dnDSA dokonuje się ze wskazań. Skuteczność zahamowania progresji cAMR zależy natomiast od jak najwcześniejszej interwencji terapeutycznej. Z tego względu celowa wydaje się okresowa systematyczna ocena występowania dnDSA u biorcy przeszczepu nerki, podobnie jak wiele ośrodków transplantacyjnych wprowadziło zasadę wykonywania tzw. biopsji protokolarnych przeszczepu.

Biorąc powyższe przesłanki pod uwagę uważam temat rozprawy doktorskiej lek. Agnieszki Urzykowskiej za istotnie ważny i aktualny.

Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy 114 stron tekstu podzielonego na wstęp, cele pracy, materiał i metodykę badań, wyniki, dyskusję i wnioski.

Streszczenia ujęto w języku polskim i angielskim. Piśmiennictwo liczy 141 pozycji, właściwie dobranych i w większości aktualnych.

Celem podstawowym pracy nakreślonym przez Autorkę była ocena skuteczności trójlekowego schematu immunosupresji stosowanej u chorych niskiego/umiarkowanego ryzyka w zapobieganiu powstawania dnDSA w czasie dwuletniej obserwacji.

Celami dodatkowymi były:

1. ocena losów przeszczepu w badaniu retrospektywnym, u dziecięcych biorców przeszczepu nerki, u których badanie w kierunku DSA wykonywano tylko ze wskazań klinicznych;
2. zdefiniowanie rzeczywistej częstości obecności DSA w badaniu prospektywnym z 2-letnią obserwacją, u dziecięcych biorców przeszczepu nerki z grupy niskiego/umiarkowanego ryzyka immunologicznego, u których badanie w kierunku dnDSA wykonywano protokolarnie (w określonych punktach czasowych);
3. wykazanie istotności klinicznej powstawania dnDSA w grupie prospektywnej dla czynności przeszczepu;
4. ocena wpływu siły immunosupresji na ryzyko powstawania dnDSA:

- zidentyfikowanie wartości C_0 TAC, przy której dnDSA nie występowały;
- określenie wpływu wartości wskaźnika zmienności stężeń C_0 TAC na powstawanie dnDSA;
- określenie czy wartość wskaźnika skumulowanej ekspozycji na trójlekową immunosupresję wg. skali Vasudeva (zmodyfikowanej dla dzieci) ma wpływ na wytwarzanie dnDSA.

Badaniem objęto 67 chorych po przeszczepieniu nerki będących pod opieką Kliniki Nefrologii Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego Instytucie „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka”.

Stworzono dwie grupy badane:

- I. grupę retrospektywną ($n=29$) po transplantacjach wykonanych w latach 2002 – 2013, u których wykonywano oznaczenie przeciwciał DSA tylko ze wskazań klinicznych.
- II. grupę prospektywną ($n=38$) po transplantacjach wykonanych w latach 2017-2018, u których oznaczenia DSA wykonywane było protokolarnie, w kolejnych sześciu punktach czasowych do 2 lat po przeszczepieniu, niezależnie od stanu klinicznego.

Oceniano ponadto wskaźnik zmienności stężenia C_0 takrolimusu w czasie 1 i 2 lat po transplantacji wyliczany na podstawie wszystkich kolejnych wyników badanych stężeń. Biopsje nerki wykonywano u pacjentów należących do obu grup wyłącznie ze wskazań klinicznych. Ich wyniki oceniano w patomorfologicznej skali Banff. Ocenę obecności i (pośrednio) miano przeciwciał (wyrażone jako MFI – *Mean Fluorescence Intensity*) wykonano techniką multiplexów przy użyciu analizatora Luminex.

W ocenie wyników Autorka zastosowała metody statystyki opisowej i wnioskowania statystycznego posługując się pakietem statystycznym SAS oraz arkuszem kalkulacyjnym Excel. W przypadku zmiennych, które cechowały się rozkładem normalnym zastosowano testy parametryczne (test T Studenta), a w przypadku niespełnienia założeń testu parametrycznego – testy nieparametryczne (test Mann-Whitney). W celu oceny zależności między zmiennymi kategorycznymi stosowano test chi kwadrat niezależności. W przypadku małych liczebności (liczebność poniżej 5 w polu tabeli kontyngencji) zastosowano dokładny test Fishera.

Wyniki zestawiono na 19 tabelach i 10 rycinach. Autorka wykazała w prospektywnej dwuletniej ocenie pacjentów niskiego/średniego ryzyka immunologicznego wzrost częstości występowania dnDSA z wartości 8% po 3 miesiącach, poprzez 11% po 6, 16% po 12 i 21% po 24 miesiącach obserwacji; w 75% przypadków były to przeciwciała klasy II, a w pozostałych 25% - klasy I; przy czym we wszystkich potwierdzonych przypadkach wartość MFI dnDSA była niższa od 3000, a wartość kalkulatora ryzyka DSA-RIS (ang. *DSA-Representative Scoring System*) oceniającego u dzieci po transplantacji nerki ryzyko rozwoju odrzucania humoralnego była niska.

Biopsję nerki przeszczepionej ze wskazań wykonano u 18% pacjentów z grupy prospektywnej. W 70% przypadków rozpoznano ostre odrzucanie lecz bez cech odrzucania humoralnego; Przeżycie czynności przeszczepu nerki w grupie prospektywnej wynosiło po roku obserwacji 100%, po 2 latach - 97%;. Tym niemniej, obecność dnDSA wykazywała związek z 4.5 -krotnie wyższym ryzykiem pogorszenia czynności przeszczepu nerki,

Autorka poddała ponadto analizie podgrupy chorych obserwowanych prospektywnie: pacjentów którzy wytworzyli przeciwciała oraz chorych nie wytwarzających przeciwciał. Podgrupy te nie różniły się pod względem zakresu i dawek stosowanych leków immunosupresyjnych, choć - pacjenci dnDSA (-) mieli istotnie wyższą wartość mediany stężenia takrolimusu. Z drugiej strony nie wykazano istotnej różnicy w zakresie wartości współczynnika zmienności TAC C₀ między pacjentami dnDSA (-) i dnDSA(+) oraz- nie wykazano istotnej różnicy w zakresie wartości wskaźnika Vasudeva obliczonego po 12 i 24 miesiącach po transplantacji .

Na istotną uwagę zasługują także wyniki uzyskane w badaniu grupy retrospektywnej. Autorka wykazała, że w grupie tej (przy 100% obecności dnDSA, w tym w 28% klasy I, w 52% klasy II, a w 21% obydwu klas) w 66 % wykonanych biopsji graftu wykazano cechy cAMR, a 41% chorych utraciło przeszczep w ciągu 2.4 roku po wykryciu dnDSA. W grupie tej wartość mediany stężenia takrolimusu (TAC C₀) była istotnie niższa i wynosiła 5,6 vs 7.3 ng/ml (p<0.0001); wartość współczynnika zmienności stężenia takrolimusu, w okresie dwuletniej obserwacji przed wykryciem dnDSA, była wprawdzie wyższa w porównaniu do wartości występującej w grupie prospektywnej, lecz na granicy istotności statystycznej.

Analizując obie podgrupy sumarycznie Autorka wykazała, że wartość mediany stężenia takrolimusu u pacjentów dnDNA (-) była istotnie wyższa, niż u chorych dnDSA (+), odpowiednio 7.4 vs 6.0 ($p < 0.0001$).

Dyskusja jest bardzo rozbudowana na 20 stronach tekstu i przynajmniej częściowo mogłaby zostać umieszczona we wstępie do pracy. Tym niemniej, Autorka bardzo rzetelnie podsumowuje uzyskane wyniki porównując je z danymi z piśmiennictwa. Wskazuje także na ograniczenia pracy, które mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki badań.

Autorka sformułowała następujące wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

Wniosek podstawowy: Trójlekowa immunosupresja, składająca się z takrolimusu, mykofenolanu mofetylu i prednizonu, stosowana po transplantacji nerki u pediatrycznych pacjentów niskiego/umiarkowanego ryzyka immunologicznego, w większości przypadków zapobiega powstawaniu swoistych przeciwciał przeciwko niezgodnym antygenom dawcy (dnDSA), przy czym ten efekt jest przede wszystkim skutkiem stosowania takrolimusu i utrzymywania jego stężenia w górnych wartościach zalecanego zakresu.

Wnioski dodatkowe:

1. Obecność przeciwciał dnDSA wykrywana w badaniu wykonywanym ze wskazań klinicznych (w grupie retrospektywnej) była związana z obecnością odrzucania przeszczepu (potwierdzonego biopsją) w 2/3 przypadków (w tym w 66% o charakterze przewlekłego humoralnego odrzucania) oraz utratą przeszczepu nerki w 41% przypadków w ciągu 2.4 roku od ich wykrycia.
2. W prospektywnej dwuletniej ocenie pacjentów niskiego/średniego ryzyka immunologicznego wykazano systematyczny wzrost częstości występowania dnDSA z wartości 8% po 3 miesiącach, poprzez 11% po 6, 16% po 12 i 21% po 24 miesiącach obserwacji; w 75% przypadków były to przeciwciała klasy II, a w pozostałych 25% klasy I.
3. Obecność przeciwciał dnDSA wykazywana prospektywnie, miała związek z istotnym (4.5-krotnie wyższym) ryzykiem pogorszenia czynności przeszczepu nerki w ciągu dwuletniej obserwacji, wyrażonej jako szacowana wielkość