



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Ръководител катедра – проф. Д-р Доброслав Кюркчиев, дмн

Д-р Петя Стефанова Янкова

**АЛОИМУНЕН ОТГОВОР – ОЦЕНКА НА РИСКА ОТ РАЗ-
ВИТИЕ НА АНТИТЯЛО-МЕДИИРАНА РЕАКЦИЯ НА
ОТХВЪРЛЯНЕ ПРИ БЪБРЕЧНА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОНС
„ДОКТОР“**

Научен ръководител:

Проф. д-р Красимир Проданов Янев, дм

Научен консултант:

Проф. д-р Елисавета Йорданова Наумова-Григорова, дмн

София, 2024 г.

Дисертационният труд е написан в обем от 235 страници и съдържа 19 фигури и 41 таблици. В библиографията са цитирани 346 източника (1 на кирилица и 345 на латиница).

Изследванията свързани с дисертацията са провеждани на територията на Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, София.

Докторантът работи в Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, София.

Консултант статистически анализи: проф. Тодор Кундурджиев, дм

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен за защита пред научно жури от Катедрен съвет на Катедра по клинична имунология, МФ, МУ-София

Защитата на дисертацията ще се състои на **26.07.2024 г. от 12:30 ч. в аула „Проф. д-р Александър Чирков“ на УМБАЛ „ПРОФ. Д-Р АЛЕКСАНДЪР ЧИРКОВ“** на откритото заседание на научното жури в състав:

1. проф. Анастасия Михайлова, дм (рецензия)
2. проф. д-р Фани Мартинова, дмн (рецензия)
3. Доц. д-р Велислава Терзиева, д.м. (становище)
4. доц. д-р Милена Николова, д.м. (становище)
5. Доц. д-р Трифон Червенков, д.м. (становище)

Авторефератът, рецензиите и становищата по дисертационния труд са на разположение на интернет страницата на МУ-София.

Номерата на таблиците и фигурите не съответстват на тези в дисертационния труд.

СЪДЪРЖАНИЕ

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	7
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	8
IV. РЕЗУЛТАТИ	16
V. ОБСЪЖДАНЕ	41
VI. ОБОБЩЕНИЕ	64
VII. ИЗВОДИ.....	67
VIII. ПРИНОСИ	68
ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ.....	69

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

Ат – антитела

БТ – бъбречна трансплантация

Иг (Ig) – имуноглобулин

ХБН – хронична бъбречна недостатъчност

На латиница:

ABMR – антияло-медирана реакция на отхвърляне

CDC – комплемент зависим лимфоцитотоксичен тест

CMV – цитомегаловирус

cPRA – изчислени панел-реактивни антитела

DGF – забавена функция на присадката

dnDSA – de novo синтезирани донор-специфични алоантитела

DSAs – донор-специфични алоантитела

EBV – Epstein-Barr вирус

FCXM – флоуцитометричен кросмач

GFR – скорост на гломерулна филтрация

HAR – свръхостро отхвърляне

HLA – човешки левкоцитни антигени

LmXM – Luminex донор-специфичен кросмач

MFI – среден интензитет на флуоресценция

MHC – главен комплекс на тъканна съвместимост

PNV – отрицателна предиктивна стойност

PPV – положителна предиктивна стойност

PRA – панел-реактивни антитела

SAB – единични антигенни сфери

VXM – виртуален кросмач

XM – кросмач

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Трансплантацията е едно от най-значимите медицински постижения на ХХ век. Тя често е единственото лечение в краен стадий при чернодробна, сърдечна и белодробна недостатъчност. Пациентите с хронична бъбречна недостатъчност (ХБН) могат да бъдат лекувани чрез различни видове диализно лечение, а бъбречната трансплантация (БТ) обикновено се приема като най-доброто средство както за подобряване качеството на живот, така и за ефективността на разходите на здравната система. Тя е най-често провежданата трансплантация в световен мащаб и е метод за лечение на пациенти в краен стадий на хронично бъбречно заболяване. Вземането на орган с цел трансплантация може да се извърши от човешки труп (след като смъртта е установена, съгласно медицински критерии и ред) или жив донор, от когото може да се вземе само един от чифтните органи, след предварително установяване, че органът, който се взема и оставащият орган имат напълно запазена функция.

По своята същност трансплантацията е резултат от техническия напредък и фактът, че тя е технически осъществима, даде повод за задълбочено изследване на имуногенетичните механизми, водещи до клинично значими реакции на отхвърляне.

Около 11-13% от възрастното население страдат от заболявания на бъбреците и една част от тях прогресират до бъбречна недостатъчност. Прогнозите са, че 2 милиона души по света страдат от ХБН, а броят на пациентите, които се диагностицират, продължава да нараства с 5-7% годишно. Диализата и трансплантацията са единствения изход, но около 58% от тези болни не достигат до тях, защото умират от сърдечно-съдови усложнения, което е с 30 до 40 пъти повече в сравнение с общата популация. Понастоящем пациентите с бъбречна недостатъчност имат две възможности за лечение:

1. Трансплантация: бъбреци от живи и починали донори.
2. Диализа: хемодиализа или перитонеална диализа.

За пациенти, които са трансплантирани, перспективата е положителна. Но има остър недостиг на донорски органи. Има повече от 100 000 пациенти с бъбречна недостатъчност в списъка на чакащите за трансплантация в САЩ, а в България техният брой е над 780.

Ползата от трансплантацията трябва да бъде оценявана в дългосрочен план. Данните за процента преживяемост на трансплантираните бъбреци след една година в различните страни са достъпни на уебсайта на националните организации за трансплантация или са публикувани в медицинската научна литература. Те демонстрират, че БТ дава добри резултати във всички аспекти. Освен това тези данни показват, че разликата в преживяемостта на присадката при трансплантиране на бъбрек от жив и от трупен донор е малка, факт, който насърчава използването на органи от трупни донори, когато е възможно, вместо да се поема риск, макар и малък, да се навреди на жив донор.

Основна цел на трансплантацията е подобряване на дългосрочната преживяемост. Повишението ѝ ще намали броя на пациентите, връщащи се на диализа, и имащи нужда от повторна трансплантация, ще подобри качеството и продължителността на

живота им, а това ще доведе и до намаляване на финансовата тежест както за пациентите, така и за здравната система. Известно е, че след успешна БТ реципиентите възстановяват бъбречната функция, която обикновено достига приблизително до 60% от функция на донорния бъбрек. С течение на времето настъпва постепенното ѝ намаляване, което е резултат от множество променливи, включително фактори, свързани с донора и реципиента, забавена функция на присадката (DGF) и епизоди на остро отхвърляне. По литературни данни 5-годишната преживяемост след трансплантация в световен мащаб е 88% от живи донори и 78% от починали донори. Продължителността на живота на бъбречно трансплантирания пациент е достигнала приблизително 22 години в световен мащаб. Увеличаването ѝ е свързано до голяма степен и с имунологичната подготовка и посттрансплантационния мониторинг, както и с трансплантационната фармакология.

Наличието на алоантитела в реципиентите, чакащи БТ, срещу човешки левкоцитни антигени (HLA) на потенциални донори се смяташе за основна пречка за провеждане на бъбречна трансплантация. С навлизането в рутинната практика на нови методи за измерване и характеристика на силата на тези донор-специфични антитела (DSAs), стана възможно провеждането на БТ и при силно сенсibiliзирани реципиенти, след стратификация на имунологичния риск.

Предварително формираните антитела срещу HLA могат да доведат до анти-тяло-медирано отхвърляне (AMR) и остават значителна бариера за провеждане на бъбречна трансплантация. Откриването на HLA антитела, особено на донор-специфични антитела, е много важна стъпка за оценка на риска преди трансплантация, свързана с оптимален подбор на донор, както и за преживяемост на присадката.

В този труд ние описваме предтрансплантационния алоантителен статус на пациентите, включени в листата на чакащи БТ, шанса тези пациенти да получат подходящ орган и възможността да го съхранят функциониращ за по-дълъг период от време.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел на изследването

1. Да се характеризират демографският, клиничният и алоимунният статус на кандидатите за бъбречна трансплантация, регистрирани в служебния регистър на ИАМН.

2. Да се проучи ролята на алоимунния профил на потенциалния реципиент при оценка на имунологичния риск преди трансплантация.

2.2. Задачи на изследването

1. Да се анализират демографски и клинични фактори и връзката им с алоимунния отговор при реципиенти за бъбречна трансплантация, регистрирани в служебния регистър на ИАМН.

2. Да се анализират наличието/честотата, видът, специфичността и силата на алоимунния отговор при реципиенти за бъбречна трансплантация, регистрирани в служебния регистър на ИАМН.

3. Да се анализират класически и неклассически сенсibiliзиращи фактори, които могат да повлияят върху продукцията на анти-HLA антитела.

4. Да се проследи динамиката в алоантителния статус на пациентите, чакащи БТ във времето.

5. Да се съпоставят честотите на HLA-A, -B, -C, -DRB1 и -DQB1 алелни групи/антигени в групи от здрави индивиди и донори на органи от българската популация с алоантителните специфичности на сенсibiliзираните потенциални реципиенти за БТ, за да се оцени дялът на потенциалните донори, носещи съответния несъвместим антиген и следователно неподходящи за пациента от имунологична гледна точка.

6. Да се въведе твърдофазов микросферов метод за откриване на донор-специфични антитела (Luminex кросмач) и да се оцени възможността за приложение в рутинната практика.

7. Да се анализират данните от рутинните кръстосани проби за съвместимост и да се оцени прогностичната стойност на алоантителния статус на пациента за резултата от проспективния кросмач – виртуален кросмач.

8. На базата на анализите да се разработи алгоритъм за оценка на антидонорна имунна реактивност от хуморален тип, който да намери приложение в рутинната практика за оптимизиране и прецизиране подбора на реципиентите при трансплантация.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА И БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

3.1.1. Подбор на групите

Подборът на пациентите, включени в дисертационния труд, беше извършен в Клиника по клинична имунология (ККИ) с банка за стволови клетки на УМБАЛ „Александровска“ – София, след подписване на информирано съгласие. Оформени бяха следните групи:

Първата група (група I) включва 600 пациенти с хронична бъбречна недостатъчност (ХБН), регистрирани в служебния регистър на Изпълнителната агенция медицински надзор (ИАНН), на които през периода от януари 2021 до декември 2021 г. беше анализиран антителният статус (табл. 1).

Таблица 1. Възрастово-полова характеристика на пациентите от група I

Пол	Възраст				
	N	Mean	SD	Min	Max
Мъже	359	42,18	12,80	29,0	72,70
Жени	241	43,41	12,18	13,30	69,70
Общо	600	42,68	12,56	29,0	72,70

Втората група (група II) включва 208 пациенти от регистъра на чакащи бъбречна трансплантация (БТ), които според алоантителния си статус бяха подразделени на две групи: **IIa** – реципиенти, положителни за анти-HLA антитела (n=109); **IIb** – отрицателни за алоантитела (n=99) (табл. 2).

Таблица 2. Възрастово-полова структура на изследваните пациенти от група II

Група	Пол	N	Възраст			
			Mean	SD	Min	Max
Позитивни IIa	Мъже	38	48,11	10,92	26,00	68,00
	Жени	71	48,96	10,89	26,00	71,00
	Общо	109	48,66	10,86	26,00	71,00
Негативни IIb	Мъже	62	47,26	11,53	14,00	72,00
	Жени	37	51,41	10,91	20,00	72,00
	Общо	99	48,81	11,43	14,00	72,00

Третата група (група III) включва 204 случайно подбрани неродствени клинично здрави индивиди от българската популация, без фамилна анамнеза за наследствени заболявания и с нормална бъбречна функция. 104 от изследваните индивиди са

мъже, а 100 са жени, на възраст $32,5 \pm 6,5$ години. Мотивът за включването на контролна група от здрави индивиди беше въз основа на честотите на различните HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 алелни групи/антигени в здравата българска популация да се оценят шансовете за наличие на антитела към тях при пациентите с положителен алоантителен статус.

Четвъртата група включва 197 трупни донори от българската популация, без фамилна анамнеза за наследствени заболявания и с нормална бъбречна функция, включваща 114 мъже и 83 жени, на средната възраст $45,1 \pm 20,5$ г., подадени за типизиране от ИАТ или ИАМН в периода януари 2008 до май 2023 година. С този анализ целим да се опитаме да прогнозираме вероятността за антидонорна реактивност при сенсibiliзираните реципиенти от листата на чакащите БТ въз основа на честотите на различните HLA алелни групи/антигени в групата от трупни донори.

Петата група се състои от реципиенти и донори, между които е извършен проспективен и/или ретроспективен кросмач. В нея са включени 746 потенциални реципиенти за БТ, 155 потенциални живи и 102 трупни донори. Обобщени и анализирани са резултатите от 913 флоуцитометрични кросмача (Flow cytometry crossmatch – FCXM), извършени в периода януари 2010 г. – декември 2017 г., от които 755 с актуални и 158 с исторически серуми. Идеята е да се потърси корелация между наличието, локусната специфичност и силата на донор-специфичните антитела с резултатите от проспективния и/или ретроспективния кросмач при сенсibiliзирани и несенсибилизирани реципиенти, с което да се допринесе за разработването на протокол/алгоритъм за виртуален кросмач при бъбречна трансплантация.

3.2. МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА АЛОАНТИТЕЛА

3.2.1. Стандартен комплемент-зависим лимфоцитотоксичен метод (complement-dependent cytotoxicity – CDC)

CDC анализът идентифицира фиксиращи компонента антитела, които могат да предизвикат свърхостра реакция на отхвърляне. Лимфоцити с познати HLA антигени се инкубират с непознат серум и заешки комплемент. Ако серумът съдържа антитела, способни специфично да се свържат с HLA антигените върху мембраната на лимфоцитите, настъпва комплемент-медирана цитолитиза. Отчитането се извършва на флуоресцентен инвенторен микроскоп, след оцветяване на клетките с флуоресцентни багрила за разграничаване на отрицателните (живи) лимфоцити от положителните (мъртви) лимфоцити. Реакцията се оценява с процента на положителните (мъртви) лимфоцити. Този метод определя основно цитотоксични анти-HLA клас I антитела. За определяне на алоантителата бяха използвани клетки от 45 здрави донори, с предварително определени HLA формули, които съставят т.нар. клетъчен панел. Резултатите се изразяват като процент Панел Реактивни Антитела (ПРА). ПРА за даден пациент се изчисляват като броят донорни клетки реагирани с неговия серум (положителните реакции) се разделя на общия брой донори. Методът е изпълняван съгласно съответната стандартна оперативна процедура (СОП) на ККИ.

3.2.2. Микросферови флуориметрични методи (Luminex)

За разлика от клетъчните методи при тези се използват рекомбинантни HLA молекули, прикачени към микросфери. При наличие на HLA антитела в серума на реципиента, те се свързват с HLA върху микрочастиците. Образуваният HLA антиген-антитяло комплекс се открива чрез флуоресцентно-конюгиран античовешки IgG, а анализът се извършва с Luminex платформа. Последната генерира полуколичествен резултат за всяка сфера със среден интензитет на флуоресценция (mean fluorescence intensity – MFI), който се сравнява с отрицателен контролен MFI, за да се определи дали има HLA антитяло в анализираната проба. Базираните на микросфери анализи са с висока специфичност и чувствителност, откриват фиксиращи и нефиксиращи компонента, както и нискотитърни алоантитела. Чрез тях могат да бъдат разграничени клас I от клас II антитела в една проба, да се определят HLA специфичностите и изотиповете на антителата.

За **скрининг** на HLA антитела бе използван LABScreen Mixed кит (One Lambda, USA), предназначен за откриване на антитела срещу HLA клас I и клас II, както и към MHC клас I свързана верига A (MICA).

Определянето на HLA специфичностите на антителата бе извършено чрез твърдофазови анализи с единични антигени (SAB). Използвани са LABScreen™ Single Antigen HLA Class I и LABScreen™ Single Antigen HLA Class II китове (One Lambda, USA), предназначени за откриване на антитела съответно срещу HLA клас I и HLA клас II специфичности.

Микросферовите тестове са изпълнени съгласно инструкциите на производителя и съответните СОП на ККИ. Пробите са събирани и анализирани на апарат LABScan 3DTM (Luminex FLEXMAP 3D) със софтуерна програма – HLA Fusion™.

3.2.3. Трицветен метод за флоуцитометричен кросмач (Flowcytometric crossmatch – FCXM)

Кросмач реакцията с поточна цитометрия (FCXM) е по-чувствителен от цитотоксичния кросмач (CDC-XM), позволявайки откриване и на нискотитърни, както и на нефиксиращи компонента HLA антитела. Стандартният трицветен FCXM се базира на инкубация на изолирани донорни лимфоцити със серума на реципиента, по време на която наличните алоантитела се свързват със съответните несъвместими донорни антигени, експресирани от лимфоцитите. Откриването на свързаните към лимфоцитите антитела се осъществява чрез прибавяне на FITC конюгиран античовешки IgG (Fab')₂ фрагмент. Едновременно с това чрез моноклонални антитела, белязани с различни флуорохроми, се маркират Т- (CD3 PerCP) и В- (CD19 PE) клетките. Анализът на резултатите се осъществява чрез флоуцитометър. Чрез оформяне на електронен прозорец (gate) по физичен (FSC) и флуоресцентен параметър (FL), се селектират за анализ само флуоресцентно маркираните Т- (FL3) или В- (FL2) лимфоцити. Построяват се отделни хистограми за Т-клетките и за В-клетките, показващи силата на флуоресценция за FITC маркирания (FL1) античовешки имуноглобулин. Количественото изражение на резултатите е на базата на флуоресцентен индекс (FI=съотношение

между стойност на пробата и на отрицателната контрола). За положителни са приемани стойности на FI > 1.57 за Т-клетъчен и FI > 2.0 за В-клетъчен FCXM, определени при въвеждане и валидиране на метода. FCXM са изпълнени съгласно съответната СОП на ККИ и анализирани на флуоцитометър FACSCanto II със софтуер BD FACSDIVA™ (BD Biosciences).

3.2.4. Микросферов метод за откриване на донор-специфични антитела (донор-специфичен кросмач, Luminex DSA-LumXm)

Материал за обработка

Донорни лимфоцити и серум/и на реципиенти

Необходими реактиви и консумативи

Използван е LIFECODES Donor Specific Antibody (DSA) кит (Immucor, USA), предназначен за откриване на HLA клас I и клас II антитела в серума на реципиента срещу несъвместимите HLA антигени на донора.

Необходими апаратура

Апарат Luminex 100 със софтуер MATHCHIT v.13

Принцип на метода

Донорни лимфоцити, изолирани от периферна кръв или слезка, се използват като изходен материал за HLA антигени. Изолираните клетки се разтварят с нейонен детергент. След етап на центрофугиране за отстраняване на клетъчните остатъци и фрагменти лизатът може да се използва незабавно или да се съхранява замразен за бъдеща употреба.

DSA китът включва смес от сфери Luminex. Две групи от сферите в сместа са конюгирани с моноклонални антитела, специфични за HLA клас I или клас II. При смесване с лизата тези две групи сфери ще уловят разтворените HLA на донора, превръщайки ги в донор-специфична HLA мишена за антитела в серумната проба на потенциалния реципиент. Сместа от сфери съдържа и контролни сфери, за да се мониторира количеството на фона при анализа и да се гарантира, че в теста е използван подходящият конюгат.

След свързване на донорните HLA молекули сферите се прехвърлят на филтърна плака и се промиват. Добавя се серум на потенциалния реципиент, предварително разреден в дилуент и се инкубира със сферите за 30 минути. Следва друго промиване и прибавяне на разреден античовешки IgG-PE конюгат към пробата. След последна инкубация за 30 минути в ямките се прибавя промиващ буфер, плаката се поставя в апарат Luminex, чрез който се събират пробите и данните за анализ.

DSA наборът съдържа и контролен реагент, който да се използва с всеки лизат. Контролният реагент за лизата (Lysate Control Reagent – LMLCR) се тества паралелно със серумните проби, за да се потвърди свързването на HLA към сферите. Този реагент представлява смес от биотинилирани моноклонални антитела, специфични за HLA и свързващи HLA клас I и клас II гликопротеините. Биотинилираните моноклонални антитела се детектират със стрептавидин-PE конюгат (SA-PE).

DSA съдържа и контролна система за верифициране на цялата работна процедура: суха (лиофилизирана) лимфоцитна контрола, отрицателен контролен серум и

положителен контролен серум (съдържащ антитела към HLA клас I и клас II антигени). Контролната система трябва да се включва при всяко тестване.

Преди тестването на серумите е необходима подготовка, включваща приготвяне на лизата на донора/ите и на лиофилизираната лимфоцитна контрола.

Приготвяне на лимфоцитната контрола

Леофилизатът от лимфоцити се разтваря с 500 мкл клетъчна културелна среда (RPMI 1640), като е готов за употреба след най-малко 1 час престой на стайна температура (20° - 24°C) и периодично внимателно размесване, гарантиращо равномерно суспендиране на клетките. За да се утаят, клетките се центрофугират на 1000-1500 rcf за 5 минути. Супернатантата се отстранява и към утаените рехидратирани клетки се прибавя 500 мкл, разреден 1:10 с дестилирана вода, лизиращ буфер. За да се лизират напълно клетките, клетъчната суспензия се оставя да престои 3 минути, след което се вортексират и центрофугират на 1000-1500 rcf за 5 минути, за да се утаят клетъчните мембрани. Супернатантата (лимфоцитен лизат) се прехвърля в чиста етикетирана епруветка.

Готовият лимфоцитен лизат е годен при съхранение на 2-8°C, за предпочитане върху лед, за кратък период от време, не по-дълъг от 4 часа. Може да се разпредели в малки количества (за еднократна употреба) в добре затворени етикетирани епруветки и да се съхранява на -70°C до -80°C в продължение на две години. Ако се използва замразен лизат, след размразяването му той трябва да се центрофугира на 12 000 rcf за 5 минути.

Приготвяне на лизат от донорни лимфоцити

Използват се изолирани чрез градиентно центрифугиране лимфоцити от периферна кръв или от слезка. Независимо от източника на донорни клетки, е необходимо да се оцени общият обем клетки, необходим за извършване на изследването. За целта клетъчната суспензия се центрофугира, утаените клетки се разтварят в равен обем RPMI 1640 и се определя концентрацията им (с автоматичен брояч или с камера на Bürker). Необходимата концентрация за всяка ямка е приблизително $2,2 \times 10^6$ клетки. Според изходната концентрация на клетките се изчислява какъв обем от пробата трябва да се взема, за да се получи желаната концентрация от $2,2 \times 10^6$ клетки за ямка.

Необходимият обем клетъчна суспензия се центрофугира на 1000-1500 rcf за 10 минути, за да се утаят клетките. Супернатантата се отстранява и се добавя необходимият обем разреден лизиращ буфер към клетъчния седимент. За всеки 10 мкл от клетъчната суспензия се изисква 100 мкл разреден лизиращ буфер. За да се лизират напълно, клетките се разбъркват и вортексират в продължение на 3 минути. Следва центрофугиране на сместа при 1000-1500 rcf за 5 минути за утаяване на клетъчните мембрани. Супернатантата (лимфоцитен лизат) се прехвърля в чиста етикетирана епруветка и се центрофугира на 12 000 rcf за 5 минути.

При използване на замразени серуми те се центрофугират след размразяването на 12 000 rcf за 5 минути.

Изпълнение на теста

1. Необходимите за анализа сфери се центрофугират за 30 секунди на 600-800 rcf, за да се отстранят всякакви частици или течности от капачката или стените на флакона. Разбъркват се добре (~1 минута) за равномерно суспендиране на сферите.

2. 8 мкл лизат и 5 мкл сфери, които са необходими за всяко гнездо (за всеки донор и контрола) се поставят в етикетирана микроцентрофужна епруветка.

3. Смесите от лизатите и сферите се инкубират за 30 минути на тъмно при стайна температура (20-24°C). Сместа се разклаща/вортексира на всеки 10 минути.

4. Ямките на филтърната плака се подготвят спрямо протокола. Добавят се по 300 мкл дестилирана вода към определените кладенчета. След 2-5 минути, водата от плаката се аспирира чрез вакуумна помпа.

5. След 30-минутната инкубация във всяка проба се добавя по 42 мкл буфер за промиване. Разбърква се на вортекс за 30 секунди и се прехвърля цялото количество (55 мкл) от всяка разредена суспензия от сфери/лизат в ямките на филтърната плака.

6. Прибавя се по 100 мкл буфер за промиване към всяка ямка. Размесва се добре чрез потупване на плаката отстрани и съдържимото се аспирира чрез вакуумен колектор.

7. Следват три промивания с по 250 мкл буфер за ямка.

8. Прибавят се по 50 мкл, разреден LMLCR в съответните ямки.

9. Добавят се по 38 мкл разредител за проби към всяка ямка на филтърната плака, след това 12 мкл от тествания серум или контролен серум в гнездата по работния протокол.

10. Плаката се покрива със залепващ пластмасов уплътнител, поставя се в кутия, за да се предпази от светлина. Инкубира се 30 минути при стайна температура (20-24°C) на тъмно върху клатачка (200 оборота в минута).

11. След 30-минутната инкубация следват три миенета с буфер за промиване, поставен във всяка ямка. Пробите се разбъркват, като плаката се почуква отстрани и след това се аспирира.

12. Поставят се по 50 мкл, разреден стрептавидин-PE конюгат (SA-PE) в ямките, в които предварително е поставен разреден LMLCR и по 50 мкл разреден конюгат към ямките, които съдържат разредени серумни проби и серумни контроли.

13. Плаката се покрива със залепващ пластмасов уплътнител, поставя се във фолио или кутия, за да се предпази от светлина. Инкубира се 30 минути при стайна температура (20-24°C) на тъмно върху клатачка (200 оборота в минута).

14. След последната 30-минутната инкубация към гнездата на филтърната плака се добавят по 150 мкл буфер за промиване към всяка ямка. Разбърква се чрез почукване отстрани на плаката и след това пробите се събират на апарат Luminex.

Качествен контрол

Комплектът от сфери съдържа контролни сфери (CON сфери) за мониториране на качеството на работа. CON сферите измерват фона в анализа и се използват за нормализиране на сигнала от детекционните сфери. Проба 77 е конюгирана с човешки IgG и ще покаже, че конюгатът (LMCJS) е добавен към ямката. Проба 78 е конюгирана с биотинилиран протеин и ще покаже, че SA-PE (LMSA) е добавен към ямката.

Контролът на качеството на DSA се осъществява чрез включването на положителни и отрицателни контролни серуми, съответстващи на лиофилизираната лимфоцитна контрола. Тези контроли трябва да бъдат включени при всяко тестване, за да се определи дали са възникнали технически грешки или замърсяване на реактивите. При двете контролни серумни проби, проба 77 трябва да показва стойности >10 000 MFI.

Когато изсушеният лимфоцитен контрол се тества с реагент за лизатен контрол, LMLCR ще реагира както с HLA клас I, така и с клас II, давайки среден интензитет на флуоресценция >10 000. Проба 78 трябва да показва стойности >8 000 MFI. Ако контролите не отговарят на тези критерии, то тестът, конюгатът или SA-PE е замърсен.

Отчитане на резултатите

За да се определи дали свързаните сфери са положителни или отрицателни за DSA, стойността на средния индекс на флуоресценция (MFI) на всяка свързана сфера се сравнява с три cut-off стойности (фактори за корекция на фона, BAFs). Трите cut-off стойности се изчисляват от фона, измерен на трите контролни сфери във всяко тестово кладенче. Всяка CON сфера има формула за изчисляване на cut-off стойност на сферите за свързване на HLA от клас I и друга формула за изчисляване на cut-off стойност за свързване на HLA клас II. Двете формули за всяка сфера CON са lot-специфични. Cut-off стойността, изчислена за CON сфери, се изважда от MFI стойността на свързаните сфери. Процесът се повтаря за всяка от останалите две CON сфери, за да се получат три резултата (адаптирани MFI стойности). Пробата се счита за положителна за DSA, ако две или повече коригирани стойности на MFI са положителни. Една проба се счита за отрицателна за DSA, ако две или повече коригирани стойности на MFI са отрицателни.

Пример:

Class I HLA BAF for CON1 = 49.465(CON1)0.5312

Class I HLA BAF for CON2 = 34.622(CON2)0.5673

Class I HLA BAF for CON3 = 29.615(CON3)0.6532

Пример:

Class I HLA CaptureBead MFI – (BAF for CON1) = Adjusted MFI 1

Class I HLA CaptureBead MFI – (BAF for CON2) = Adjusted MFI 2

Class I HLA CaptureBead MFI – (BAF for CON3) = Adjusted MFI 3

3.3. Статистически методи

3.3.1. Дескриптивна статистика

Средна аритметична – за оценка на централната тенденция;

Стандартно отклонение – за оценка на разсейването;

Честотни таблици – абсолютни честоти – броят на единиците в отделно взета група; относителни честоти – броят на единиците в отделно взета група, отнесен към общия брой единици в съвкупността.

3.3.2. Хи-квадрат тест (Chi-square test) – при изследване на зависимости между описателни данни.

3.3.3. Критерий на Мак Немар – разновидност на хи-квадрат. Отнася се за свързани извадки и е алтернативен метод за проверка на хипотеза.

3.3.3. Сравняване на пропорции с корекция на р-стойността по метода на Бонферони (Bonferroni method).

3.3.4. Тест на Колмогоров-Смирнов при една извадка (One-Sample Kolmogorov-Smirnov test) – използва се за проверка на формата на честотното разпределение. Най-често проверката е спрямо формата на нормалното разпределение.

3.3.5. Т-тест при две независими групи (Independent-Samples T-test) – при нормално разпределение на изследваната променлива.

3.3.6. Отношение на шансовете (Odds Ratio)

Шанс (odds) – отношение на вероятността едно събитие да се сбъдне към вероятността то да не се сбъдне. Ако вероятността за сбъждане на събитието е p , то тогава шансът може да се изчисли по формулата: $odds = p/(1-p)$.

При сравняване на две групи по отношение на възникване на дадено събитие, отношението на шансовете ще даде възможност да се оцени с колко се увеличава или намалява шансът събитието да се наблюдава в едната група в сравнение с другата. Може да се изчисли по формулата:

$Odds\ ratio = (p_1/(1-p_1))/(p_2/(1-p_2))$, където

p_1 и p_2 са вероятностите за възникване на събитието в двете групи.

3.3.7. Ниво на значимост – приетото критично ниво на значимост е $\alpha = 0,05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато p стойността (p -value) е по-малка от α .

За обработка на данните от проучването е използван специализираният статистически пакет SPSS версия 16.0.

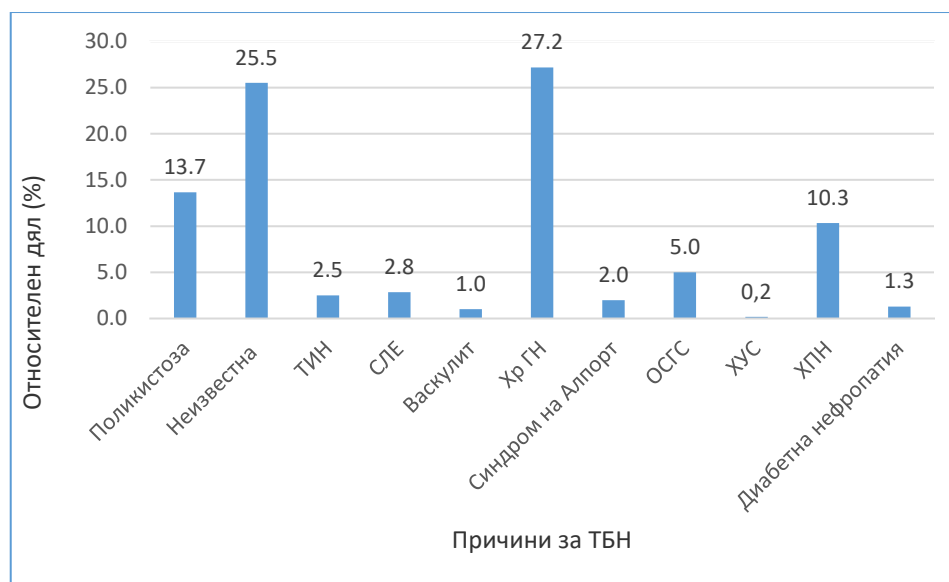
IV. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти от първа група

Бяха събрани следните данни за реципиентите: пол и възраст, диагноза; съпътстващи заболявания; продължителност на диализно лечение; данни за сенсibiliзирани събития: **класически** – кръвопреливане, бременност и трансплантация, и **некласически** – вирусни инфекции (хепатит В, хепатит С, ковид-19); поставени ваксини, хирургични интервенции и тумори; резултати, получени от анализ на техния алоантигелен статус. Критерий за включване са пациенти с бъбречна недостатъчност от регистъра на чакащи БТ за целевия период от време. Изключени от проучването са тези, за които липсват пълните данни или са трансплантирани през този период, или са починали. Отделните рискови фактори – класически и некласически, бяха анализирани като база, при която са получени съответните алоантигелни статуси.

В **първа група** пациенти преобладават мъжете, като съотношението мъже:жени е 1,5:1. Към момента на регистрация 588 (98,5%) провеждат диализа три пъти седмично, а останалите 12 (1,5%) са в преддиализна фаза.

В повечето случаи причината, довела до развитието на ХБН, е неясна (n=168; 25,5%). Сред тези с известна основна причина (фигура 1), най-честите състояния са хроничен гломерулонефрит (ХрГН) (n=175; 27,2%), хроничен пиелонефрит (ХПН) (n=74; 10,3%), фокална сегментна гломерулна склероза (n=30; 5,0%), поликистозна бъбречна болест (n=82; 13,7%).



Фигура 1. Основни причини за ТБН в изследваната популация. ТБН, терминална бъбречна недостатъчност; ТИН, тубулоинтерстициален нефрит; СЛЕ, системен лупус еритематозус; ХрГН, хроничен гломерулонефрит, биопсично доказан; ОСГС, огнищно-сегментна гломерулна склероза; ХУС, хемолитично-уремичен синдром; ХПН, хроничен пиелонефрит

От класическите сенсibiliзирани събития на кръвопреливане са подложени 317 пациенти (53,8%). Броят кръвопреливания разделихме на три подгрупи: с 1 (n = 118; 36,2%), до 5 (n = 145; 45,7%) и над 5 (n = 54; 17,1%). Осемдесет и седем (14,5%)

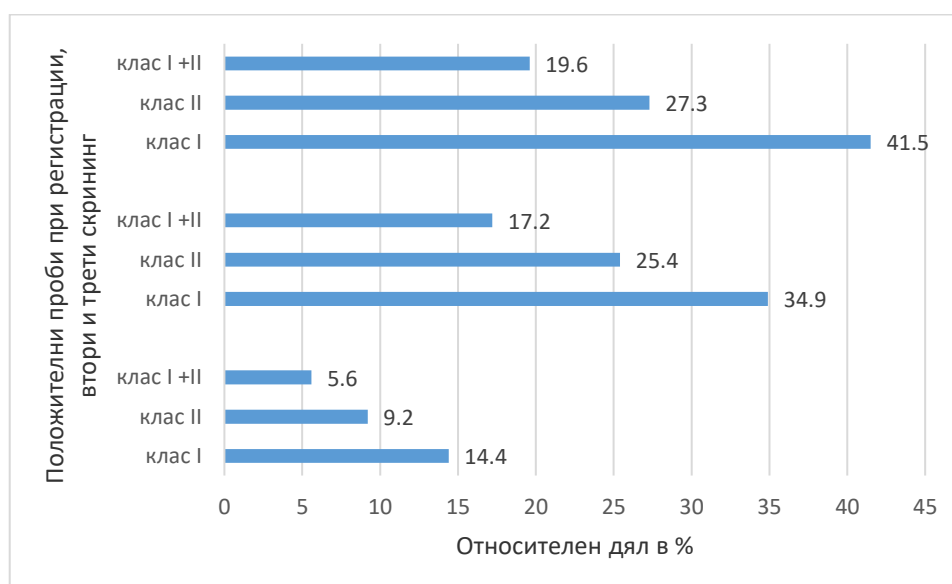
от пациентите са имали предходни трансплантации, от които с една са 76 (12,6%), а 11 (1,9%) са с две. В нашата група 165 жени от 241 (68,5%) са имали поне едно забременяване, като най-висок е процентът на жените с две забременявания – 41,3%.

Спрямо разгледаните от нас неklasическите сенсibiliзиращи събития установихме, че преболедувалите хепатит са 66 (11,0%); ковид-19 са 120 (20%), а на 143 (23,8%) са приложени ваксини (противогрипна, срещу SARS-Cov2 и срещу хепатит В) през периода на наблюдение. Подложени на хирургични интервенции са 115 (19,1%), а с тумори са били 14 или 2,3%.

Според медицинския стандарт за „Имунологична подготовка при трансплантация на органи, тъкани и клетки“ е необходимо при регистрация на пациенти, нуждаещи се от БТ, както и по време на изчакването в регистъра, да се провеждат регулярни скринингови тестове за алоантитела.

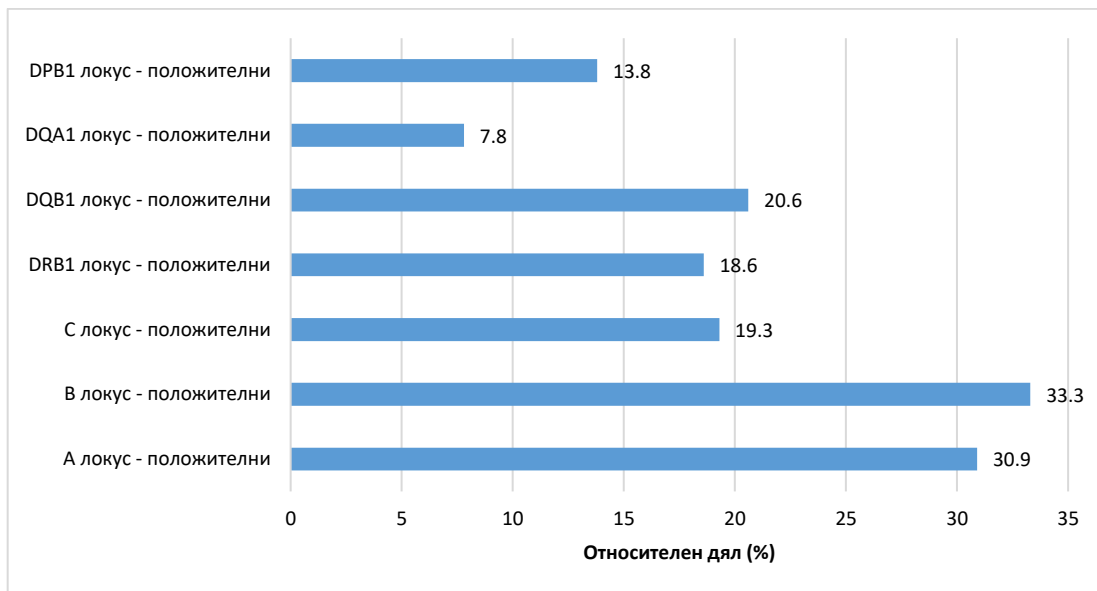
При анализа на данните от алоантителния статус установихме, че при регистрация за HLA клас I антитела са отрицателни 489 пациенти (85,6%) от изследваната група, а положителни са 82 пациенти (14,4%). За HLA клас II антитела отрицателни са 514 пациенти (90,8%), а положителни са 52 пациенти (9,2%). Положителни и за двата класа са 32 пациенти (5,59%).

В настоящото проучване изследвахме разпределението на HLA клас I антитела при регистрация и трикратно в рамките на 1 година, през четири месеца чрез два метода – CDC и Lumineх. През първия скрининг чрез CDC броят на положителните за клас I е 44 (10,9%), а през следващите втори и трети скрининг с Lumineх технология броят е 176 (34,9%) и 209 (41,5%), съответно. За клас II са проведени два Lumineх скрининга със следните резултати: 128 (25,4%) и 138 (27,3%) (фигура 2).



Фигура 2. Процент на положителните за алоантитела пациенти при регистрация, втори и трети скрининг за алоантитела клас I, клас II и едновременно положителни за клас I и клас II

От клас I алоантителата преобладават В-локусни (33,3%), следвани от А-локусни (30,9%) и С-локусни (19,3%). От клас II алоантителата преобладават DQB1-локусни (20,6%), следвани от DRB1-локусни (18,6%), DPB1-локусни (13,8%) и DQA1-локусни (7,8%) (фигура 3).



Фигура 3. Процентно разпределение на положителните резултати за алоантитела по HLA клас I и клас II локуси

Потърсихме връзка между демографските и клиничните характеристики с наличните резултати от алоантителата по HLA класове (I и II) при регистрация, както и при проведените скрининги.

Ето какво се наблюдава **при регистрация** на пациентите:

Клас I: Делът на мъжете в групата на отрицателните е сигнификантно по-голям от този в групата на положителните ($p < 0,001$). В разпределението на съпътстващия коморбилитет не откриваме значима разлика между положителните и отрицателните за алоантитела ($p = 0,644$). Същото се отнася и за дела на пациентите, провеждащи диализа. Няма статистически значима разлика между тези на диализа и на тези без такава ($p = 0,776$). Очаквано, разпределението на кръвопреливаните пациенти е по-голямо в групата на положителните за алоантитела ($p < 0,001$). Между положителните и отрицателните не се открива сигнификантна разлика в разпределението при бременност ($p = 0,309$), носителство на хепатит ($p = 0,717$) и наличието на неопластичен процес ($p = 0,998$).

Клас II: Отново делът на мъжете е по-голям при отрицателните за алоантитела в сравнение с положителните ($p < 0,001$). В съпътстващия коморбилитет и разпределението на пациентите, провеждащи диализа, няма разлика между положителните и отрицателните ($p = 0,109$; $p = 0,843$). Делът на кръвопреливаните отново е сигнификантно по-голям в групата на положителните в сравнение с отрицателните ($p = 0,005$). За клас II при регистрация делът на бременните е значимо по-голям в групата на положителните за алоантитела ($p = 0,036$). В разпределението на пациентите с и без хепатит

($p=0,848$), както и в разпределението на пациентите с и без неопластичен процес ($p=0,439$) няма разлика между положителните и отрицателните.

Ето какво се наблюдава при *първи скрининг* на пациентите, извършен с CDC тест:

Клас I: В разпределението по пол ($p=0,496$) в разпределението по съпътстващ коморбилитет ($p=0,951$) и в дела на болните, провеждащи диализа, няма значима разлика между положителните и отрицателните за алоантитела. Делът на болните, които са кръвопреливани, отново е по-висок в групата на положителните ($p=0,001$). Делът на бременните е по-висок в групата на положителните за алоантитела ($p=0,029$). Носителите на хепатит са повече в групата на положителните ($p<0,001$). Няма разлики в разпределението на болни със или без тумор между положителните и отрицателните ($p=0,527$).

Какво се наблюдава при *втори скрининг* на пациентите:

Клас I: Делът на мъжете е по-голям в групата на отрицателните ($p<0,001$). Няма разлики между положителни и отрицателни в разпределението на съпътстващ коморбилитет ($p=0,518$), в дела на болните, провеждащи диализа ($p=0,345$), при разпределението по бременност ($p=0,138$) и в разпределението на пациентите с рак ($p=0,767$). Делът на кръвопреливаните болни е по-висок в групата на положителните за алоантитела ($p<0,001$). В този скрининг делът на пациентите с хепатит в положителната група е по-голям ($p=0,022$).

Клас II: Делът на мъжете е по-голям в групата на отрицателните ($p<0,001$). Няма значима разлика в разпределението на съпътстващ коморбилитет ($p=0,791$), болни на диализа ($p=0,623$), бременни ($p=0,118$) и пациенти с рак ($p=0,392$) между положителните и отрицателните. Делът на кръвопреливаните пациенти е по-висок при положителните ($p<0,001$), при тях и носителите на хепатит в сравнение с тези без хепатит са повече ($p<0,001$).

Какво наблюдаваме при *третия скрининг* на пациентите:

Клас I: Делът на мъжете е по-голям в групата на отрицателните ($p<0,001$). Няма разлики в разпределението на съпътстващ коморбилитет ($p=0,762$), диализно болни ($p=0,682$), бременни ($p=0,289$), носители на хепатит ($p=0,129$) и карциномно болните ($p=0,702$) между положителните и отрицателните за алоантитела. Кръвопреливаните болни са сигнификантно повече в групата на положителните за алоантитела ($p<0,001$).

Клас II: Делът на мъжете е по-голям в групата на отрицателните ($p<0,001$). Няма значима разлика в разпределението на съпътстващ коморбилитет ($p=0,419$), диализно болни ($p=0,557$) и пациенти с рак ($p=0,715$) между положителните и отрицателните. Делът на кръвопреливаните ($p<0,001$), бременните ($p=0,034$) и носителите на хепатит ($p=0,011$) е по-голям в групата на положителните.

4.1.1. Характеристика на алоантителния статус HLA клас I и клас II– носителни дялове, изразени като процент

Антитела срещу A локус се срещат при 77,5% от положителните проби за клас I при регистрация ($n=167$), 70,0% при първи скрининг ($n=121$), 76,0% при втори

(n=159) и 78,5% при трети скрининг (n=171). При проследяване на пациентите, положителни за HLA-A локусни алоантитела, в рамките на една година не се отчете сигнификантна промяна в процента положителни стойности за съответните специфичности.

Антитела срещу В локус се срещат при 85,0% от положителните проби за клас I при регистрация (n=181), 75,0% при първи скрининг (n=127), 81,7% при втори (n=172) и 82,3% (n=184) при трети скрининг. При проследяване на пациентите, положителни за HLA-B локусни алоантитела при регистрация и в рамките на трите скрининга не се отчете сигнификантна промяна в процента положителни стойности за съответните специфичности.

Антитела срещу С-локусни антигени се срещат при 47,5% от положителните проби за клас I при регистрация (n=99), 60,0% при първи скрининг (n=83), 50,3% при втори (n=103) и 48,3% (n=108) при трети скрининг. При проследяване на пациентите, положителни за HLA-C локусни алоантитела, при регистрация и в рамките на трите скрининга не се отчете сигнификантна промяна в процента положителни стойности за съответните специфичности.

Антитела срещу DR локус се срещат при 55,1% от положителните проби за клас II при регистрация (n=94), 68,8% при втори (n=97) и 69,6% при трети скрининг (n=103). При проследяване на пациентите, положителни за HLA-DR локусни алоантитела при регистрация и в рамките на два последователни скрининга, не се отчете сигнификантна промяна в процента положителни стойности за съответните специфичности.

Антитела срещу DQB1 локус се срещат при 55,1% от положителните проби за клас II при регистрация (n=106), 72,7% при втори (n=108) и 74,6% при трети скрининг (n=114). Наблюдава се повишение на относителния дял положителни за HLA-DQB1 локусни алоантитела при втори скрининг, спрямо стойностите при регистрация, като тази тенденция се запазва при третия скрининг.

Антитела срещу DQA1 локус се срещат при 30,6% от положителните проби за клас II при регистрация (n=40), 32,0% при втори (n=41) и 31,2% (n=46) при трети скрининг. Не се установи статистически значима разлика в процента положителни за HLA-DQA1 локусни алоантитела при регистрация и в двата скрининга за съответните специфичности.

Антитела срещу DPB1 локус се срещат при 30,6% от положителните проби за клас II при регистрация (n=69), 49,2% при втори (n=71) и 48,6% при трети скрининг (n=73). И тук не се установи статистически значима разлика в процента положителни за HLA-DPB1 локусни алоантитела при регистрация и в двата скрининга за съответните специфичности.

4.1.2. Сенсibiliзиращи събития

4.1.2.1. Бременност

Не се установи статистически значима връзка между бременността, като сенсibiliзиращ фактор и образуването на антитела срещу HLA-A-, B-, C-, DQB1- и DPB1- локусни антигени в групата на положителните за алоантитела по тези локуси

($p=0,159$; $p=0,344$; $p=0,542$; $p=0,141$ и $p=0,107$). 42,9% от жени ($n=69$), имали поне едно забременяване, са развили антитела срещу А локусни антигени, 46,6 % срещу В-локус ($n=75$), 23,6 % срещу С-локус ($n=38$), 29,8% срещу DQB1 локус ($n=48$) и 18,0% срещу DPB1 локус ($n=29$).

Изненадващо се установява връзка между бременността и клас II антитела, и по-точно срещу DRB1 и DQA1. 28,6% ($n=6$) от жените, имали поне една бременност, са развили антитела срещу DRB1, спрямо 10,7% при нераждали ($p=0,007$) и 13,0% ($n=21$) към DQA1, като този тип антитела липсват при жени, които не са забременявали ($p=0,004$). Процентът на положителни резултати срещу тези два локуса (DRB и DQA1) е статистически значимо по-висок при забременявали спрямо незабременявали жени.

4.1.2.2. Кръвопреливане

Кръвопреливането, разгледано като самостоятелно сенсibiliзиращо събитие, е довело до синтеза на алоантитела в по-голям процент срещу клас I – 38,6% срещу HLA-A локусни антигени ($n=120$); 42,1% срещу HLA-B-локусни антигени ($n=131$); 24,4% срещу HLA-C локусни антигени ($n=76$) при пациенти, които са имали дори едно кръвопреливане. При клас II разпределението е, както следва: срещу HLA-DR ($n=76$, 24,4%), DQB1 ($n=85$, 27,3%), DQA1 ($n=33$, 10,6%) и DPB1 ($n=59$, 19%) локусни антигени, съответно. Установи се статистически значима връзка между кръвопреливането и синтеза на алоантитела срещу антигени от всички HLA локуси ($p<0,001$)

Не се установи връзка между кръвопреливани пациентки, които са имали и регистрирана бременност, с наличните алоантитела при регистрация за клас I ($p=1,000$) и клас II ($p=0,397$); при първи скрининг за клас I ($p=0,193$); при втори скрининг за клас I ($p=1,000$) и клас II ($p=0,360$); при трети скрининг за клас I ($p=0,825$) и II ($p=0,361$).

Установихме, че мъжете имат по-висок риск за сенсibiliзация след кръвопреливане в сравнение с незабременявали жени ($p=0,002$) за клас I при регистрация. Такава зависимост не се установи за клас II при регистрация, както и в последващите ги скрининги.

4.1.2.3. Предходни трансплантации

При всички трансплантирани и върнати на диализа се установява наличие на алоантитела

4.1.3. Сравнения на HLA клас I антитела при регистрация, при първи, втори и трети скрининг (McNemar Test)

За да видим дали има динамика в алоантителния статус на пациентите от регистъра на чакащи във времето, приложихме теста на McNemar, сравнявайки алоантителния статус при регистрация с резултатите от първи, втори и трети скрининг, както и първи спрямо втори и трети, така и втори спрямо трети скрининг.

При регистрация броят на положителните проби за клас I е бил 52 от 379 (13,7%), които при първия скрининг са станали 34, като само 9 пациенти са останали положителни и при регистрация и при първи скрининг ($p=0,038$). При втория скрининг този брой е нараснал на 67 от 483 пациенти (13,9%), като тези, които са останали

положителни, са 62 ($p < 0,001$). При третия скрининг положителните проби са 73 от 483 (15,1%) пациенти, като тези, които са останали положителни, са 66 ($p < 0,001$).

Сравнявайки втори и трети скрининг спрямо първи се установи, че броят на положителните проби за клас I при втори скрининг от 125 е нараснал на 139 при третия спрямо първи скрининг ($p < 0,001$), 31 (9,04%) са останали положителни от втория скрининг, а при третия техният брой е 28 (8,21%) ($p < 0,001$).

Съпоставяйки клас I положителни от трети спрямо втори скрининг виждаме отново разлика ($p = 0,006$) в посока на повече положителни проби (160 от 442 – 36,1%) при втори спрямо трети скрининг, където броят на положителните резултати е 143 (32,4%).

4.1.4. Сравнения на HLA клас II антитела при регистрация, при втори и трети скрининг (McNemar Test)

При регистрация броят на положителните проби за клас II е бил 39 от 480 (8,13%), като 29 са останали положителни от периода на регистрация до втори скрининг ($p < 0,001$) и 34 до третия скрининг, при който положителните проби са 46 от 479 (9,6%) ($p < 0,001$).

Съпоставяйки трети спрямо втори скрининг за клас II не се установи статистически значима разлика ($p = 0,761$).

4.2. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти от втора група

Втората група от 208 пациенти от регистъра на чакащи бъбречна трансплантация според алоантителния им статус, проследяван във времето, беше разделена на две подгрупи: **IIa – реципиенти, положителни за анти-HLA антитела, и IIb – отрицателни за алоантитела.** Потърсихме връзка между възрастта в двете подгрупи (позитивни и негативни за алоантитела) пациенти, но не се установи статистически значима възрастова разлика ($p = 0,924$).

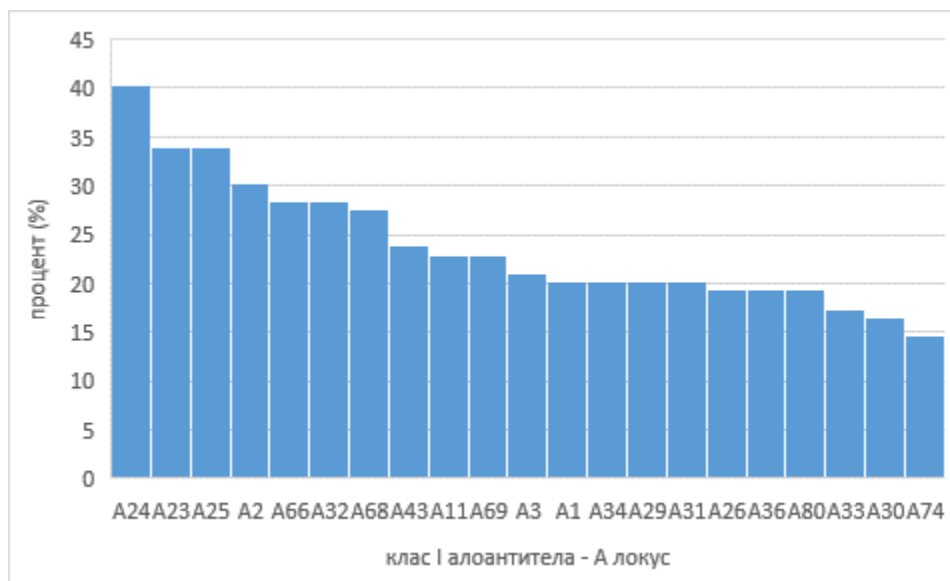
В група IIa не се установиха статистически значими разлики в разпределението по класове алоантитела и пол ($p = 0,174$), както и връзка между класовете алоантитела и възрастта ($p = 0,585$).

Разпределението на пациентите по основното заболяване, довело до хронична бъбречна недостатъчност (ХБН), не показва значимо различие между положителните и отрицателните за алоантитела групи. Изключение правят пациентите с диабетна нефропатия, които са значимо повече в антияло-негативната група ($p < 0,05$).

Кръвопреливането е най-често срещаното се самостоятелно сенсibiliзиращо събитие в двете групи ($n = 53$; 25,5%), следвано от бременностите ($n = 22$; 10,6%). Най-честите комбинации от сенсibiliзиращи събития са, на първо място, кръвопреливане и бременност ($n = 26$; 12,5%), следвани от кръвопреливане и ваксина ($n = 13$; 6,3%). Предходни трансплантации като сенсibiliзиращо събитие, самостоятелно ($n = 11$; 10,1%) или в комбинация с други такива, се наблюдават само при антияло-положителните реципиенти.

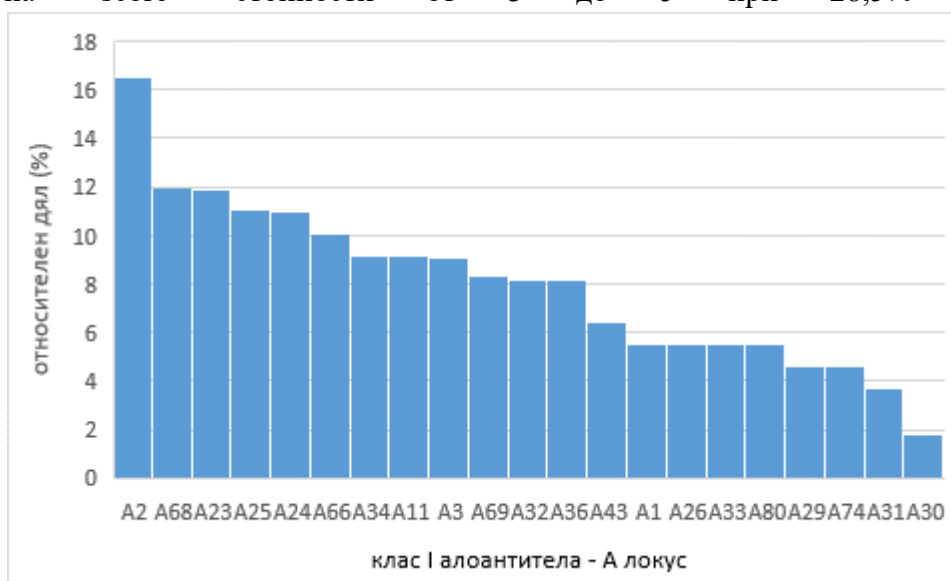
При анализ на антителата срещу отделните HLA локусни специфичности прави впечатление, че честотите на антителата срещу различните HLA-A локусни антигени (фигура 4) варират от 14,7 (A74) до 40,4% (A24), като най-често откриваните ($> 30\%$)

антителни специфичности са към A24 (40,4%), следвани от A23 и A25 (33,9%) и на трето място – срещу A2 (30,3%).



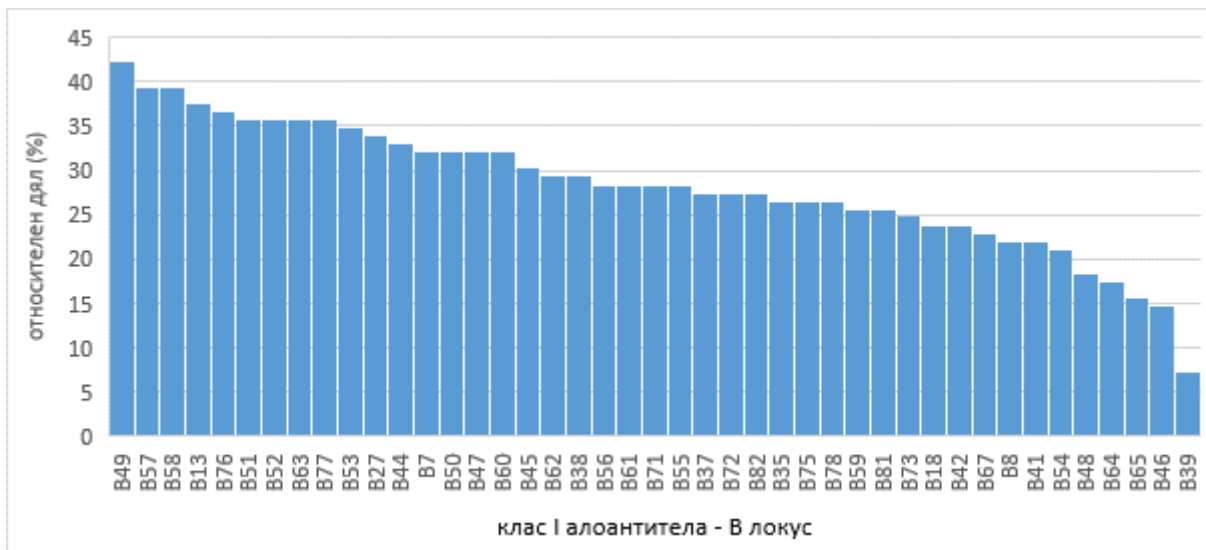
Фигура 4. Разпределение на алоантитела срещу HLA-A локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група Па (n=109)

За целите на статистическите анализи в настоящото проучване MFI са приравнени към “score” стойности (от 1 до 8), необходими за оценка на силата/количеството на антителата, както следва: < 500 = 1; 501-999 = 2; 1000-1500 = 3; 1501-2999 = 4; 3000-4999 = 5; 5000-9999 = 6 (силно положителни); ≥ 10 000 = 8 (много силно положителни). Нашите анализи показват, че най-силен е имунният отговор не към най-често срещаните алоантитела срещу HLA-A локусни антигени HLA-A24, A25, а към HLA-A2 (фигура 5), израз на който е по-големият относителен дял на високи “score” стойности на антителата срещу този антиген (6 при 11,9% и 8 при 4,6%). Докато при антителата срещу HLA-A24, които са най-честите, силата на реакция е по-слаба, с преобладаване на “score” стойности от 3 до 5 при 28,5% от случаите.



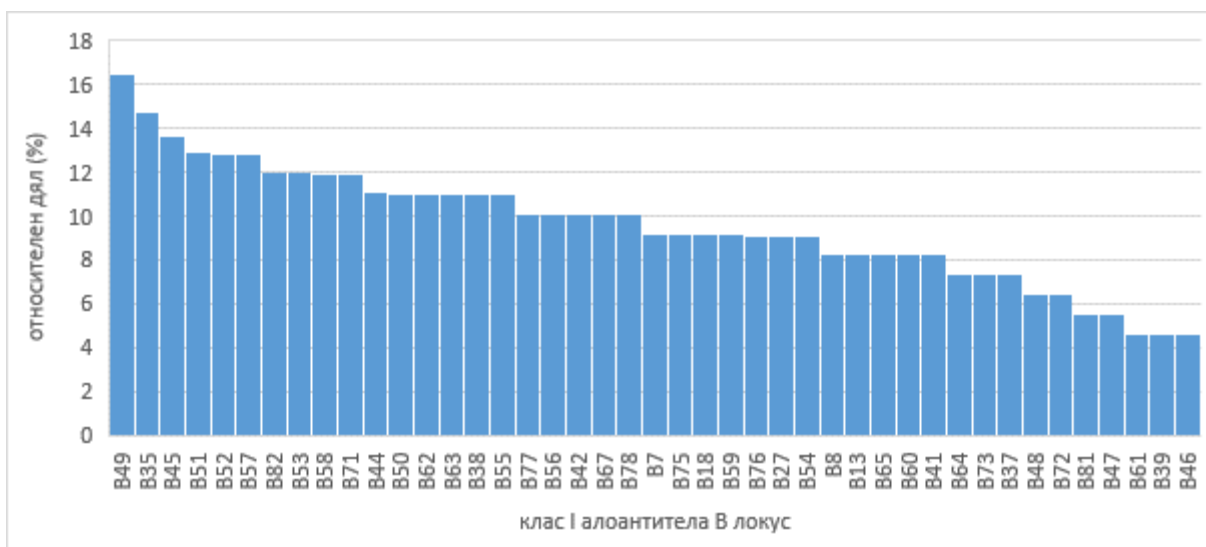
Фигура 5. Процентно разпределение на алоантителата срещу HLA-A локусни специфичности със „score” стойности 6 и 8.

Честотите на антителата срещу различните HLA-B локусни антигени варират от 7,3% (B39) до 42,2% (B49), като най-често откриваните (>30%) антителни специфичности са към HLA-B49 (42,2%); B57 и B58 (39,4%); B76 (36,7%), B13 (37,6%), B51, B52 и B77 (35,8%); B53 (34,9%); B27 (33,9%); B44 (33%); B7, B47 и B62 (32,1%) (фигура 6).



Фигура 6. Разпределение на алоантителата срещу HLA-B локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група IIa (n=109).

Силата на антителата варира, като най-разпространеното антитяло срещу HLA-B49 (42,2%) е и най-силно позитивиращото се, следвано по сила на реакциите от B35 и B45, чиято честота на откриване е под 30% (фигура 7).



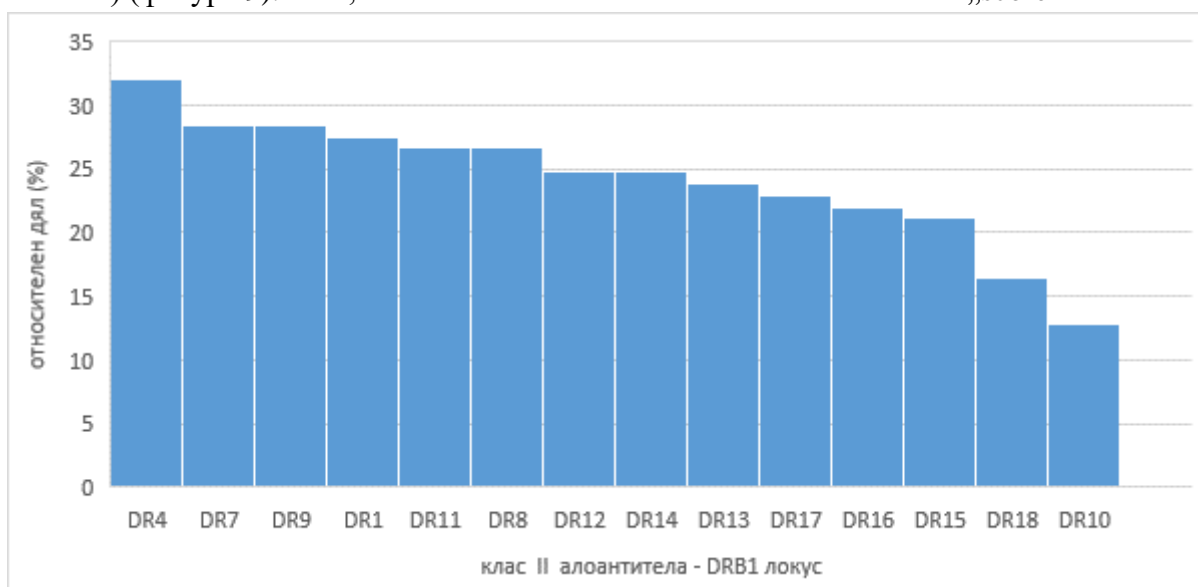
Фигура 7. Процентно разпределение на алоантитела срещу HLA-B локусни специфичности със „score” стойности 6 и 8.

Антителата към HLA-C локусните антигени варират от 2,8% (Cw16) до 15,6% (Cw10). Тези антитела се откриват доста по-рядко в сравнение с тези към другите два HLA клас I локуси (A и B). Те са най-често насочени срещу HLA-C*03:04 (Cw10 - 15,6%), следвани от Cw17 (12,8%) и Cw9, 4 и 8 (10,1%).

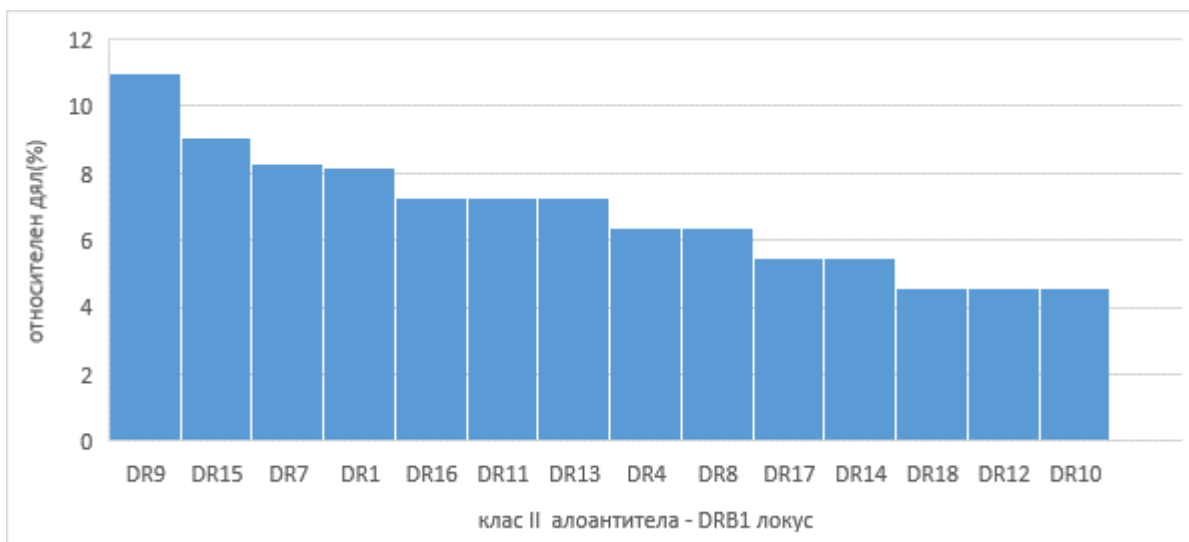
Силата на антителата варира, Cw9 е най-силно позитивиращото се антитяло, следвано от Cw10 и Cw17 и Cw18. Сред анти-HLA-Cw антителата преобладават по-ниските „score” стойности, което се приема като маркер за слаба имунна реактивност.

Антителата срещу HLA клас II са определяни като специфични за HLA-DR (DRB1), DQB1, DQA1 и DPB1. HLA-DR локусните антитела варират от 12,8% (DR10) до 32,1% (DR4) (фигура 8). Най-често се откриват тези срещу HLA-DR4 (32,1%), DR7 и DR9 (28,4%).

Силата на антителата варира, DR9 показва най-високи стойности (score 8), следвано от DR15 и DR7, чиято честота на откриване е по-ниска (21,1% и 28,4%, съответно) (фигура 9). DR4, което е най-честото антитяло има по-малък „score”.



Фигура 8. Разпределение на алоантитела срещу HLA-DR локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група IIa (n = 109).



Фигура 9. Процентно разпределение на алоантитела срещу HLA-DR локусни специфичности по „score” стойности 6 и 8.

От HLA-DQ локусните антитела се откриват насочени срещу алфа (A) и бета (B) веригата на DQ антигените поради значимия полиморфизъм и на двете вериги. По отношение на HLA-DQB1 алореактивността най-чести са антителата срещу HLA-DQB1*03 алели (48.6%), представени като HLA-DQ7, DQ8 и DQ9 серологични специфичности, като от тях най-голям е дялът на DQ8. Най-често срещаното антитяло е срещу DQ6 (22,9%), следвано от DQ5 (19,3%) и DQ2 (18,3%).

Трябва да се отбележи, че според силата на свързване с антигена с най-висок процент силно положителни реакции (score 6 и 8) са антителата срещу DQ6 и DQ5, без значими вариации на антителата срещу останалите DQ специфичности.

Анализът на антителата срещу DQA1 веригата се базира на алореактивността към HLA-DQA1 алелни специфичности, за някои от които серологичните аналози все още не са дефинирани (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>). Най-често се откриват антителата срещу DQA1*01 алелната група, включваща HLADQA*01:01 (13,8%), *01:02, *01:03 и *01:04 алел. Най-рядко се откриват антителата срещу DQA1*03:03 и DQA1*05:03 (0,9%) алелите. Не сме открили антителата към DQA1*05:05 алела.

В силата на свързване не се наблюдават значими вариации.

Анализът на HLA-DPB1 специфичните антителата показва, че най-често се срещат антителата срещу HLA-DPB1*17 (17,4%), DPB1*13 (16,5%), DPB1*03 (15,6%) и DPB1*05 (15,6%) алелни групи, представени в използваните от нас китове за специфичност съответно чрез DPB1*17:01, DPB1*13:01, DPB1*03:01 и DPB1*05:01 алел. Най-рядко се откриват антителата срещу DPB1*10 (0,9%) и DPB1*11 (0,2%), а при изследваните от нас реципиенти не са установени такива срещу DPB1*20:01 и DPB1*23:01 алелите.

Сред HLA-DP антителата не се установява силно позитивна реактивност – „score” 8.

4.3. Обобщение на имунологичните характеристики на изследваните лица от трета група

При третата група от случайно подбрани неродствени клинично здрави индивиди (контролна група) бяха оценени честотите на различните HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 алелни групи/антигени в българска популация и шансовете за наличие на антигени към тях при пациентите с положителен алоантителен статус. С този анализ се опитваме да прогнозираме вероятността за антидонорна реактивност при сенсibiliзираните реципиенти от листата на чакащите БТ.

Резултатите показаха, че шансовете за наличие на повечето HLA специфичности в контролната група са по-ниски (\downarrow), но за някои се увеличава (\uparrow) в сравнение с антителните им аналози в групата на пациентите. При сравняване на двете групи по отношение на възникване на дадено събитие, отношението на шансовете дава възможност да се оцени с колко се увеличава или намалява шансът събитието да се наблюдава в едната в сравнение с другата група. Представяме и анализираме резултатите за някои от най-честите алоантителни HLA специфичности при пациентите. Прави впечатление, че вероятността за носителство на **HLA-A2** в контролната група е 30%, което означава, че останалите 70% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A2 в контролната група да е 0,432 (табл.3). В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-A2 в серумите на тези пациентите е също 30%, т.е. в 70% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (A2) в пациентската група е също 0,432. В конкретния пример отношението на шансовете е почти 1 (0,993), показващо че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с най-голяма вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-A2) в контролната група е много нисък – 0,71%. Вероятността за носителство на **HLA-A24** в контролната група е 13%, което означава, че останалите 77% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A24 в контролната група да е 0,149 (табл.3). В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-A24, което е най-често срещаното в серумите на тези пациентите, е 40%, т.е. в 60% от пациентите ще липсва, и тогава изчисленият шанс за това антитяло (A24) в пациентската група е 0,678. При сравняване на двете групи по отношение на шансовете се оцени, че отношението е почти 0,220, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 22% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-A24) в контролната група е 77,96%. Антителата срещу **HLA-A23** и **A25** се откриват с еднаква вероятност в пациентската група – 33,9%, а изчисленият шанс и за двете антителни специфичности е 0,513 (табл.3). Докато вероятностите (3,9% за HLA-A23 и 1,7% за HLA-A25) и шансовете (0,041 и 0,018) за двата антигена при здравите са различни. Отношението на шансовете за A23 е 0,080, показващо че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 8,0% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. За HLA-A25 изчисленото отношение е 0,034, т.е. 3,4% вероятност за несъвместим по донор по този антиген. Изменението на шанса за HLA-23 и HLA-25 в контролната група намалява и е съответно 92,04% и 96,59%.

Таблица 3. Анализ на шансовете за наличие на HLA-A антигени в контролната (n = 204) и антитела в пациентската група (n = 109)

A*	Вероятност за антигени в контролната група	Вероятност за антигени в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антигени в пациентската група	Отношение на шансовете (контроли/пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
1	0,130	0,202	0,149	0,253	0,590	41,02↓
2	0,302	0,303	0,432	0,435	0,993	0,71↓
3	0,080	0,211	0,087	0,267	0,326	67,44↓
11	0,069	0,229	0,074	0,297	0,248	75,20↓
23	0,039	0,339	0,041	0,513	0,080	92,04↓
24	0,130	0,404	0,149	0,678	0,220	77,96↓
25	0,017	0,339	0,018	0,513	0,034	96,59↓
26	0,054	0,193	0,057	0,239	0,238	76,18↓
29	0,012	0,202	0,012	0,253	0,049	95,12↓
30	0,017	0,165	0,018	0,198	0,089	91,14↓
31	0,032	0,202	0,033	0,253	0,130	86,98↓
32	0,047	0,284	0,049	0,397	0,123	87,68↓
33	0,022	0,174	0,023	0,211	0,107	89,27↓
36	0,005	0,193	0,005	0,239	0,021	97,94↓
43	0,003	0,239	0,003	0,314	0,008	99,20↓
66	0,003	0,284	0,003	0,397	0,006	99,37↓
68	0,025	0,275	0,025	0,379	0,066	93,38↓
69	0,012	0,229	0,012	0,297	0,042	95,81↓
80	0,003	0,193	0,003	0,239	0,010	98,95↓

Вероятността за носителство на **HLA-B49** в контролната група е 2,5%, което означава, че останалите 97,5% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-B49 в контролната група да е 0,025 (табл.4). В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-B49 в сурумите на тези пациентите е най-голяма – 42,2%, т.е. в 57,8% от пациентите ще липсват и тогава изчисленият шанс за това антитяло (B49) в пациентската група е 0,730. При сравняване на двете групи по отношението на шансовете, отношението за B49 е почти 0,034, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 3,4% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-B49) в контролната група е 96,56% . Вероятностите за наличието (35,8%) и за липсата (64,2%) на антитела към **HLA-B51** и **HLA-B52** при алоимунизираните пациентите (група IIb), както и шансът (0,558) са еднакви (табл.4). Вероятността за носителство на HLA-B51 в контролната група е 15,4%, а шансът – 0,183, докато за HLA-B52 са съответно 3,4% вероятност и 0,036 шанс. Отношението на шансовете за HLA-B51 е 0,327, показващо че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 32,7% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор, докато за HLA-B52 това отношение е 0,064, показващо вероятност от 6,4% за

несъвместим по този антиген донор за реципиентите с антитела срещу HLA-B52. Изменението на шанса за наличие на HLA-B51 и -B52 в контролната група е съответно 67,26% и 93,63%.

Таблица 4. Анализ на шансовете за наличие на HLA-B антигени в контролната (n = 204) и антитела в пациентската група (n = 109)

В*	Вероятност за антигени в контролната група	Вероятност за антитела в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антитела в пациентската група	Отношение на шансовете (контроли/пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
7	0,047	0,321	0,049	0,473	0,103	89,66↓
8	0,052	0,220	0,054	0,282	0,193	80,75↓
13	0,017	0,376	0,018	0,603	0,029	97,10↓
18	0,088	0,239	0,097	0,314	0,308	69,20↓
27	0,047	0,339	0,049	0,513	0,095	90,47↓
35	0,150	0,266	0,176	0,362	0,485	51,50↓
37	0,007	0,275	0,007	0,379	0,020	98,03↓
38	0,029	0,294	0,030	0,416	0,073	92,73↓
39	0,022	0,073	0,023	0,079	0,287	71,30↓
41	0,015	0,220	0,015	0,282	0,053	94,71↓
44	0,088	0,330	0,097	0,493	0,196	80,36↓
45	0,003	0,303	0,003	0,435	0,006	99,42↓
47	0,010	0,321	0,010	0,473	0,021	97,91↓
49	0,025	0,422	0,025	0,730	0,034	96,56↓
50	0,022	0,321	0,023	0,473	0,048	95,22↓
51	0,154	0,358	0,183	0,558	0,327	67,26↓
52	0,034	0,358	0,036	0,558	0,064	93,63↓
53	0,012	0,349	0,012	0,536	0,023	97,68↓
55	0,015	0,284	0,015	0,397	0,038	96,24↓
56	0,005	0,284	0,005	0,397	0,012	98,76↓
57	0,034	0,394	0,036	0,650	0,055	94,54↓
58	0,012	0,394	0,012	0,650	0,019	98,08↓

Вероятността за носителство на **HLA-Cw4** в контролната група е 16,8%, което означава, че останалите 83,2% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-Cw4 в контролната група да е 0,202 (табл.5). В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-Cw4 в серумите на тези пациентите е 10,1%, т.е. при 89,9% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (Cw4) в пациентската група ще е 0,112. При сравняване на двете групи по отношение на шансовете отношението за Cw4 е 0,557, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 55,7% вероятност

да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-Cw4) в контролната група се увеличава – 44,32%.

Вероятността за носителство на **HLA-Cw17** в контролната група е 1,6%, което означава, че останалите 98,4% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-Cw17 в контролната група да е 0,016 (табл.5). В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-Cw17 в серумите на тези пациентите е 12,8%, т.е. при 87,2% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (Cw17) в пациентската група ще е 0,147. При сравняване на двете групи по отношение на шансовете за Cw17 той е 0,108, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 10,8% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-Cw17 в контролната група намалява – 89,20%.

Таблица 5. Анализ на шансовете за наличие на HLA-Cw антигени в контролната (n = 204) и антитела в пациентската група (n = 109)

Cw	Вероятност за антигени в контролната група	Вероятност за антитела в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антитела в пациентската група	Отношение на шансовете (контроли/пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
1	0,070	0,055	0,076	0,058	0,770	23,03↑
2	0,102	0,083	0,113	0,091	0,800	19,96↑
4	0,168	0,101	0,202	0,112	0,557	44,32↑
5	0,032	0,092	0,033	0,101	0,322	67,79↓
6	0,090	0,064	0,099	0,068	0,693	30,69↑
7	0,219	0,092	0,280	0,101	0,362	63,82↑
8	0,027	0,101	0,028	0,112	0,250	75,02↓
12	0,121	0,073	0,138	0,079	0,572	42,85↑
14	0,031	0,046	0,032	0,048	0,670	32,99↓
15	0,039	0,073	0,041	0,079	0,517	48,33↓
16	0,023	0,028	0,024	0,029	0,832	16,82↓
17	0,016	0,128	0,016	0,147	0,108	89,20↓

Вероятността за носителство на **HLA-DR4** в контролната група е 8,6%, което означава, че останалите 91,4% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DR4 в контролната група ще е 0,094 (табл.6). В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-DR4 в серумите на тези пациентите е 32,1%, т.е. в 67,9% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DR4) в пациентската група ще е 0,473. Отношението на шансовете за DR4 е 0,199, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 19,9% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DR4 в контролната група намалява – 80,15%.

Вероятността за носителство на **HLA-DR11** в контролната група е най-голяма – 20,3%, а останалите 79,7% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA- DR11 в контролната група ще е 0,255 (табл.6). В групата на положителните за алоантитела пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-DR11 е 26,6%, т.е. в 73,4% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DR11) в пациентската група е 0,362. Отношението на шансовете между двете групи за DR11 е 0,705, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност имат 70,5% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA- DR11) в контролната група намалява – 29,54%.

Таблица 6. Анализ на шансовете за наличие на HLA-DR антигени в контролната ($n = 204$) и антитела в пациентската група ($n = 109$)

DRB1*	Вероятност за антигени в контролната група	Вероятност за антитела в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антитела в пациентската група	Отношение на шансовете (контроли/пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
1	0,103	0,275	0,115	0,379	0,302	69,76↓
4	0,086	0,321	0,094	0,473	0,199	80,15↓
7	0,069	0,284	0,074	0,397	0,186	81,43↓
8	0,027	0,266	0,028	0,362	0,077	92,34↓
9	0,005	0,284	0,005	0,397	0,012	98,76↓
10	0,015	0,128	0,015	0,147	0,102	89,84↓
11	0,203	0,266	0,255	0,362	0,705	29,54↓
12	0,007	0,248	0,007	0,330	0,023	97,74↓
13	0,110	0,239	0,124	0,314	0,395	60,53↓
14	0,061	0,248	0,065	0,330	0,198	80,20↓
15	0,064	0,211	0,068	0,267	0,254	74,56↓
16	0,157	0,220	0,186	0,282	0,660	34,02↓

Вероятността за носителство на **HLA-DQ3** в контролната група е 38,6%, т.е. останалите 61,4% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DQ3 в контролната група ще е 0,627 (табл.7). В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-DQ3 в сурумите на тези пациенти е 16,2%, т.е. в 83,8% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DQ3) в пациентската група ще е 0,193. Отношението на шансовете за DQ3 е 0,308, показващо, че реципиенти с антитела срещу тези специфичности имат 30,8% вероятност за несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DQ3 в контролната група се увеличава – 69,18%. Вероятността за носителство на **HLA-DQ6** в контролната група е 12,1%, а останалите 87,9% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DQ6 в контролната група ще е 0,137 (табл.7). В групата на положителните за алоантитела

вероятността да се открият антитела срещу HLA-DQ6 е най-голяма – 22,9%, т.е. в 77,1% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DQ6) в пациентската група ще е 0,297. При сравняване на двете групи по отношение на шансовете за DQ6 той е 0,461, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 46,1% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DQ6 в контролната група намалява с 53,87%.

Таблица 7. Анализ на шансовете за наличие на HLA-DQB1 антигени в контролната ($n = 204$) и антитела в пациентската група ($n = 109$)

DQB1 *	Вероятност за антигени в контролната група	Вероятност за антитела в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антитела в пациентската група	Отношение на шансовете (контроли/пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
2	0,145	0,183	0,169	0,224	0,754	24,59↓
3	0,386	0,162	0,627	0,193	0,308	69,18↑
4	0,024	0,165	0,025	0,198	0,125	87,50↓
5	0,325	0,193	0,482	0,239	0,496	50,40↑
6	0,121	0,229	0,137	0,297	0,461	53,87↓

4.4. Обобщение на имунологичните характеристики на изследваните пациенти от четвъртата група

Четвърта група включва 197 трупни донори, от които преобладават мъжете ($n=114$) със запазена бъбречна функция. Донорите бяха типизирани по HLA системата, чрез молекулярно биологични методи и съпоставени с алоантителния статус на пациенти от втора група.

Оценени бяха честотите на различните HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1 антигени в групата на трупните донори и шансовете за наличие на антитела към тях при пациентите с положителен алоантителен статус (IIa). HLA-C антигени и насочените срещу тях алоантитела не са включени в анализа, защото трупните донори според действащите стандарти и политики не са типизирани по HLA-C локус.

Резултатите показаха, че шансовете за наличие на повечето HLA специфичности в донорната група намаляват (↓), но за някои са по-високи (↑) в сравнение с антителните им аналози в групата на пациентите. Прави впечатление, че вероятността за носителство на **HLA-A2** в донорската група е 50,5%, което означава, че останалите 49,5% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A2 в донорската група да е 1,020 (табл.8). В групата на положителните за алоантитела вероятността да се открият антитела срещу HLA-A2 е 30,3%, т.е. в 69,7% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (A2) в пациентската група е 0,435. Оценката на шанса събитието да се наблюдава в едната в сравнение с другата група, т.е. отношението на шансовете в конкретния пример е 0,426, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 42,6% вероятност да имат несъв-

местим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-A2 в донорската група се увеличава – 57,35% . Вероятността за носителство на **HLA-A1** при донорите е 26,05%, т.е. 73,95% са с вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A1 в групата на донорите да е 0,351 (табл.8). Сред положителните за алоантитела пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-A1 е 20,2%, означаващо, че при останалите 79,8% те ще липсват, а изчисленият шанс за това антитяло в пациентската група ще е 0,253. Отношението на шансовете между двете групи е 0,721, което показва, че реципиенти с HLA-A1 антитела са с 72,1% вероятност да срещнат донор, несъвместим по този антиген. Изменението на шанса за наличие на HLA-A1 в донорската група се увеличава – 27,92%. Вероятността за носителство на HLA-A24 в донорната група е 25,5%, което означава, че останалите 74,5% са с вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A24 в тази група да е 0,342 (табл.8). При положителните за алоантитела вероятността да се открият антитела срещу HLA-A24, което е едно от най-често срещаните в серумите на тези пациенти, е 40,4%, т.е. в 59,6% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (A24) в пациентската група е 0,678. При съпоставяне на шансовете на двете групи се получи отношение 0,504, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 50,4% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-A24 в групата на донорите намалява – 49,56%.

Таблица 8. Анализ на шансовете за наличие на HLA-A антигени в донорната (n = 197) и антитела в пациентската група (n = 109)

Показател	Вероятност за антигени в донорската група	Вероятност за антитела в групата на реципиентите	Шанс за антигени в донорската група	Шанс за антитела в реципиентската група	Отношение на шансовете (Донори/реципиенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в донорската група (%)
A1	0,260	0,202	0,351	0,253	0,721	27,92↑
A2	0,505	0,303	1,020	0,435	0,426	57,35↑
A3	0,185	0,211	0,227	0,267	0,850	14,98↓
A23	0,070	0,339	0,075	0,513	0,146	85,38↓
A24	0,255	0,404	0,342	0,678	0,504	49,56↓
A25	0,040	0,339	0,042	0,513	0,082	91,81↓
A26	0,065	0,193	0,070	0,239	0,293	70,71↓
A66	0,015	0,284	0,015	0,397	0,038	96,22↓
A11	0,115	0,229	0,130	0,297	0,438	56,23↓
A29	0,015	0,202	0,015	0,253	0,059	94,07↓
A30	0,075	0,165	0,081	0,198	0,409	59,09↓
A31	0,055	0,202	0,058	0,253	0,229	77,08↓
A32	0,110	0,284	0,124	0,397	0,312	68,77↓
A33	0,040	0,174	0,042	0,211	0,199	80,09↓
A68	0,045	0,275	0,047	0,379	0,124	87,60↓
A69	0,000	0,229	0,000	0,297	0,000	100.0↓
A36	0,000	0,193	0,000	0,239	0,000	100.0↓
A43	0,000	0,239	0,000	0,314	0,000	100.0↓

A80	0,000	0,193	0,000	0,239	0,000	100.0↓
-----	-------	-------	-------	-------	-------	--------

Вероятността за носителство на **HLA-B49** в донорската група е 9,0%, което означава, че останалите 93,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-B49 в тази група е 0,099 (табл.9). При положителните за алоантитела пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-B49 в серумите им е най-голяма – 42,2%, т.е. в 57,8% от пациентите ще липсват и тогава изчисленият шанс за това антитяло (B49) в пациентската група ще е 0,730. При сравняване на двете групи отношението на шансовете за B49 е 0,136, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 13,6% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-B49 в донорската група намалява – 86,44%.

Вероятността за носителство на **HLA-B35** сред донорите е най-голям – 31,0%, което означава, че останалите 69,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-B35 в донорната група да е 0,449 (табл.9). В групата на положителните за алоантитела пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-B35 е 26,6%, а да липсват е 73,4% и тогава изчисленият шанс за това антитяло (B35) в пациентската група е 0,362. Отношението на шансовете за B35 е 0,806, или реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 80,6% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-B35 в донорската група се увеличава – 19,38%.

Вероятностите за наличието (35,8%) и за липсата (64,2%) на антитела към **HLA-B51** и **HLA-B52**, както и шансът за тези антитела (0,558) при алоимунизираните пациенти са еднакви (табл.9). Вероятността за носителството на HLA-B51 при донорите е второ по честота – 30,5%, т.е. 69,5% няма да го носят, а изчисленият шанс е 0,439, докато за HLA-B52 са съответно 4,0% вероятност и 0,042 шанс. Отношението на шансовете за HLA-B51 е 0,787, или 78,7% от реципиентите с антитела към тази специфичност има вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Докато за HLA-B52 това отношение е 0,075, показващо в сравнение с HLA-B51 почти десетократно по-малка вероятност (7,5%) за несъвместим по HLA-B52 донор за реципиентите с антитела срещу този антиген. Изменението на шанса за наличие на HLA-B51 и -B52 в донорската група е съответно 21,33% и 92,47%.

Вероятността за носителството на HLA-B18 в групата на донорите е трето по честота – 21,0%, т.е. 79,0% има вероятност да са отрицателни за този антиген, а изчисленият шанс е 0,266 (табл.9). Вероятността да се открият антитела срещу HLA-B18 сред положителните пациенти е 23,9%, а да липсват е 76,1% и изчисленият шанс за това антитяло е 0,314. Отношението на шансовете е 0,847, което показва, че 84,7% от положителните за това антитяло (B18) пациенти имат вероятност за несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-B18 в донорската група намалява – 15,29%.

Таблица 9. Анализ на шансовете за наличие на HLA-B антигени в донорската (n = 197) и антитела в пациентската група (n = 109)

Показател	Вероятност за антигени в донорската група	Вероятност за антитела в групата на реципиентите	Шанс за антигени в донорската група	Шанс за антитела в реципиентската група	Отношение на шансовете (Донори/реципиенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в донорската група (%)
B51	0,305	0,358	0,439	0,558	0,787	21,33↓
B52	0,040	0,358	0,042	0,558	0,075	92,47↓
B7	0,080	0,321	0,087	0,473	0,184	81,61↓
B8	0,125	0,220	0,143	0,282	0,507	49,29↓
B44	0,170	0,330	0,205	0,493	0,416	58,42↓
B45	0,010	0,303	0,010	0,435	0,023	97,7↓
B13	0,075	0,376	0,081	0,603	0,134	86,57↓
B38	0,065	0,294	0,070	0,416	0,168	83,17↓
B39	0,030	0,073	0,031	0,079	0,392	60,76↓
B57	0,035	0,394	0,036	0,650	0,055	94,46↓
B58	0,005	0,394	0,005	0,650	0,008	99,23↓
B18	0,210	0,239	0,266	0,314	0,847	15,29↓
B49	0,090	0,422	0,099	0,730	0,136	86,44↓
B50	0,005	0,321	0,005	0,473	0,011	98,94↓
B55	0,035	0,284	0,036	0,397	0,091	90,93↓
B56	0,010	0,284	0,010	0,397	0,025	97,48↓
B27	0,040	0,339	0,042	0,513	0,082	91,81↓
B35	0,310	0,266	0,449	0,362	0,806	19,38↑
B37	0,005	0,275	0,005	0,379	0,013	98,68↓
B41	0,030	0,220	0,031	0,282	0,110	89,01↓
B47	0,000	0,321	0,000	0,473	0,000	100,0↓
B53	0,010	0,349	0,010	0,536	0,019	98,13↓

Вероятността за носителство на **HLA-DR4** в донорската група е 16,0%, което означава, че останалите 84,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DR4 в контролната група е 0,190 (табл.10). В групата на алоимунитетизираните пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-DR4 в серумите им е голяма – 32,1%, т.е. в 67,9% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DR4) в пациентската група е 0,473. Отношението на шансовете за DR4 е 0,402, показващо че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 40,2% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DR4 в донорската група намалява – 59,83% . Вероятността за носителство на **HLA-DR11** в донорската група е 46,5%, което означава, че останалите 53,5% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DR11 в тази група е 0,869 (табл.10). В групата на положителните за алоантитела пациенти, вероятността да се открият антитела срещу HLA-DR11 в серумите им е 26,6%, т.е. в 73,4% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DR11) в пациентската група е 0,362. При сравняване на двете групи по отношение на шансовете за DR11, отношението е 0,417, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност имат

41,7% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DR11 в донорската група се увеличава – 58,34%.

Таблица 10. Анализ на шансовете за наличие на HLA-DR антигени в донорната (n = 197) и антитела в пациентската група (n = 109)

Показател	Вероятност за антигени в донорската група	Вероятност за антитела в групата на реципиентите	Шанс за антигени в донорската група	Шанс за антитела в реципиентската група	Отношение на шансовете (Донори/реципиенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в донорската група (%)
DR1	0,155	0,275	0,183	0,379	0,483	51,72↓
DR15	0,170	0,211	0,205	0,267	0,768	23,22↓
DR16	0,275	0,220	0,379	0,282	0,744	25,59↑
DR4	0,160	0,321	0,190	0,473	0,402	59,83↓
DR11	0,465	0,266	0,869	0,362	0,417	58,34↑
DR12	0,010	0,248	0,010	0,330	0,030	96,97↓
DR13	0,165	0,239	0,198	0,314	0,631	36,94↓
DR14	0,105	0,248	0,117	0,330	0,355	64,55↓
DR7	0,120	0,284	0,136	0,397	0,343	65,74↓
DR8	0,040	0,266	0,042	0,362	0,116	88,4↓
DR9	0,010	0,284	0,010	0,397	0,025	97,48↓
DR10	0,030	0,128	0,031	0,147	0,211	78,91↓

Вероятността за носителство на **HLA-DQ3** в донорската група е 60,0%, което означава, че останалите 40,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DQ3 в донорската група е 1,500 (табл.11). В групата на положителните за алоантитела (IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-DQ3 в серумите на тези пациентите е 16,2%, т.е. в 83,8% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DQ3) в пациентската група ще е 0,193. Отношението на шансовете за DQ3 е 0,129, показващо, че реципиенти с антитела срещу тези специфичности са с 12,9% вероятност за несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DQ3 в донорската група се увеличава – 87,13%.

Вероятността за носителство на **HLA-DQ6** в донорската група е 30,0%, което означава, че останалите 70,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DQ6 в донорската група да е 0,429 (табл.11). В групата на положителните за алоантитела пациенти (IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-DQ6 в серумите им е 22,9%, т.е. в 77,1% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DQ6) в пациентската група ще е 0,297. При сравняване на шансовете на двете групи за DQ6 отношението е 0,692, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 69,2% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-DQ6) в донорната група се увеличава – 30,77%.

Таблица 11. Анализ на шансовете за наличие на HLA-DQB1 антигени в донорска (n = 197) и антитела в пациентската група (n = 109)

Показател	Вероятност за антигени в донорската група	Вероятност за антитела в групата на реципиентите	Шанс за антигени в донорската група	Шанс за антитела в реципиентската група	Отношение на шансовете (Донори/реципиенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в донорската група (%)
DQ 5	0,525	0,193	1,105	0,239	0,216	78,40↑
DQ 6	0,300	0,229	0,429	0,297	0,692	30,77↑
DQ 2	0,275	0,183	0,379	0,224	0,591	40,90↑
DQ 3	0,600	0,162	1,500	0,193	0,129	87,13↑
DQ 4	0,040	0,165	0,042	0,198	0,212	79,79↓

4.5. Обобщение на имунологичните характеристики на изследваните пациенти от пета група

Анализите на данните от 913 проспективни и ретроспективни кросмач реакции показаха, че при пациенти с наличие на преформирани антитела срещу несъвместимите донорни HLA клас I антигени в 79,3% очакваният T(+)/B(+) кросмач се потвърждава с резултатите от актуалния, реално проведен кросмач. В два от случаите (6,89%) T-клетъчният кросмач е положителен, но B-клетъчният е отрицателен. При 3 (10,3%) пациенти с HLA клас I DSA T-клетъчният кросмач е отрицателен, но B-клетъчният е положителен. При наличие на HLA клас II антидонорни антитела кросмач реактивността, както се очакваше, е само срещу B-клетките – T(-)/B(+) кросмач.

По отношение на пациентите, при които не са открити алоантитела при скринингите или имат не-DSA при 97,42% от тях, резултатите от кросмача са отрицателни. Установихме обаче някои изключения – серумите на 19 (2,58%) от изследваните 737 пациенти показаха положителни резултати, несъответстващи на алоантителния профил, въз основа на който се очакваше отрицателен кросмач. Оформиха се три комбинации от актуална кросмач реактивност: 3 (0,41%) пациенти имат T-клетъчен(+)/B-клетъчен(+); 5 (0,68%) са с T(+)/B(-) и 11 (1,5%) демонстрират T(-)/B(+) FCXM.

За изясняване на тези находки извършихме допълнителни изследвания и анализи, включващи типизиране по HLA-C, -DP, -DQA локуси, типизиране на алелно ниво и допълнително тестване на серумите за антитела към тези локуси и/или алели.

В групата с неочакван T(+)/B(+) кросмач при един от пациентите с нула несъвместимост по HLA-A, -B, -DR, -DQ алелните групи допълнителните изследвания показаха наличие донор-специфични антитела срещу HLA-DP локуса (HLA-DP*05). В допълнение се установи и несъвместимост по HLA-B35 алелите, но алел-специфични антитела не можеха да се докажат поради липса на алелната специфичност на пациента в кита за специфициране на алоантителата. При втория пациент с многократни кръвопреливания, но отрицателен за алоантитела до момента на реалния кросмач, впоследствие в проспективния серум бяха доказани DSA към несъвместимия HLA-B18 антиген с много нисък MFI=624. Третият пациент е върнат на диализа след трансплантация от жив родствен донор и при рутинните скрининги има установени не-DSA от HLA клас I и II към потенциалния трупен донор, с който е извършен FCXM. Кросмачът с исторически серуми, в който е установена недонор-специфична алореак-

тивност, показва отрицателни резултати, докато този с пресен серум беше положителен. Съпоставянето на HLA формулите на донора и реципиента ни дадоха основание да предположим, че може да се касае за алел-специфични антидонорни антитела, неоткрити в предходните изследвания.

В групата на реципиентите с неочаквани T(-)/B(+) кросмач резултати, при 9/11 не са установени алоантитела, а при двама са намерени не-DSA при предходните изследвания. При 9 пациента е направен и автокросмач, като при 6 от тях той е T(-)/B(+), а при трима – T(-)/B(-). При един от реципиентките кросмач резултатите са T(-)/B(+) с трима трупни донори, а автокросмач тестовете показват същата реактивност. Тази пациентка е трансплантирана успешно от последния донор. Резултатите от последващите скрининги на реципиентите от тази група не показват наличие на алоантитела или на DSA към несъвместимите антигени на донорите, с които са имали положителен кросмач. При две пациентки с T(-)/B(+) резултат, без наличие на DSA от клас II не е правен автокросмач, но те са диагностицирани с лупусна нефропатия и с голяма вероятност може да се приеме, че се касае за автореактивност. При трима от пациентите с T(-)/B(+) кросмач автокросмач реакцията е отрицателна, липсват и DSA от клас II алоантитела.

Третата група е от реципиенти, показали T(+)/B(-) резултати от кросмач теста. Всички са имали сенсibiliзираци събития: бременности (n=1), кръвопреливания (n=1) или и двете (n=3). Трима са били положителни за преформирани недонор-специфични антитела, един е бил отрицателен за алоантитела при рутинните скрининги, а при един HLA типизирането, изследването за алоантитела и кросмач реакцията са извършени едновременно при регистрирането на реципиента. За подпомагане на клиничната интерпретация на резултатите при пациентката с отрицателен алоантителен статус бе направен автокросмач. Резултатите показаха негативен както T-, така и B-клетъчен автокросмач. Поради това положителният T-клетъчен кросмач беше интерпретиран най-вероятно в резултат на донор-специфична алореактивност, доказана впоследствие с откриването на DSA в пресния серум срещу несъвместимия HLA-B56 с MFI=1549. При останалите пациенти от тази група също бяха доказани в актуалния серум антитела към несъвместими HLA клас I антигени (при двама срещу HLA-B и при двама към HLA-A), като MFI не надвишава 2000.

За целта на проучването беше въведен и верифициран метод за Luminex DSA кросмач за определяне на донор-специфични антитела.

За верифициране на метода използвахме силно положителни серуми от участието ни във Външна Оценка на Качеството (ВОК) за определяне на алоантитела (Eurotransplant) с познати HLA клас I и клас II специфичности, както и отрицателни за антитела серуми (отрицателни контроли от китове за детекция на HLA антитела). За източник на HLA антигени използвахме клетки на донори с HLA специфичности, съответстващи на тези на антителата (фигура 10 и 11).

Class I/II DSA Results
Batch ID: LMD_27418

Run Date: 04/27/2018
Assignment Cutoff: 2, 2
Adj Val Cutoff: 0.00, 0.00
Report By: Lab Supervisor

Lot Number: 3005280 3005205-LMD
Expiration Date: 03/15/2018
Class I BAFs: 9.5600 * CON1 + 0.7910, 13.7410 * CON2 + 0.8120, 6.8150 * CON3 + 0.7840
Class II BAFs: 9.9210 * CON1 + 0.7430, 13.9200 * CON2 + 0.7510, 7.9390 * CON3 + 0.7230

Sample ID	Raw	Adj 1	Adj 2	Adj 3	Score	Assignment	Pos Cnt/Lys Cnt
Sample ID: RTCD 1035, CR	8154	8099.40	8222.38	8191.38	3	LCR	16116
Patient Name: RTCD 1035, CR							
Draw Date:							
Sample ID: RTCD 1035, 3857 R.17	3003	2105.91	1887.21	1876.89	3	Positive	21823
Patient Name: RTCD 1035, 3857 R.17							
Draw Date:							
Sample ID: RTCD 1193, CR	7770	7681.18	1380.55	1282.99	3	LCR	223
Patient Name: RTCD 1193, CR							
Draw Date:							
Sample ID: RTCD 1193, 4331 2&A.18	354	85.54	287.20	273.82	2	Positive	223
Patient Name: RTCD 1193, 4331 2&A.18							
Draw Date:							
Sample ID: RTCD 1193, 4558 2&A.18	306	-23.31	31.41	-271.99	0	Negative	1883
Patient Name: RTCD 1193, 4558 2&A.18							
Draw Date:							

Фигура 10. Резултати от микросферов кросмач тест (Lumipex кросмач) за контрол на лизата (CR), положителна (PC) и отрицателна (NC) контроли

Class I/II DSA Results
Batch ID: CONTR

Run Date: 04/13/2018
Assignment Cutoff: 2, 2
Adj Val Cutoff: 0.00, 0.00
Report By: Lab Supervisor

Lot Number: 3005280 3005205-LMD
Expiration Date: 03/15/2018
Class I BAFs: 9.5600 * CON1 + 0.7910, 13.7410 * CON2 + 0.8120, 6.8150 * CON3 + 0.7840
Class II BAFs: 9.9210 * CON1 + 0.7430, 13.9200 * CON2 + 0.7510, 7.9390 * CON3 + 0.7230

Sample ID	Raw	Adj 1	Adj 2	Adj 3	Score	Assignment	Pos Cnt/Lys Cnt
Sample ID: CR	13349	13223.09	12238.34	12063.89	3	LCR	208
Patient Name: CR							
Draw Date:							
Sample ID: PC	12750	12254.36	16074.54	15397.43	3	Positive	2068
Patient Name: PC							
Draw Date:							
Sample ID: NC	183	-117.24	-121.57	-385.60	0	Negative	19470
Patient Name: NC							
Draw Date:							

Фигура 11. Резултати на пациенти от микросферов кросмач тест (Lumipex кросмач)

За оценка на специфичността и чувствителността на кита извършихме Lumipex кросмач тест със серуми на положителни за алоантитела реципиенти с определени HLA клас I или клас II антители специфичности чрез микросферови методи с единични антигени (табл. 12).

Таблица 12. Съпоставяне на резултатите от Lumipex DSA кросмач с алоантителния профил на реципиента (Несъответстващите донорни антигени и DSA са в удебелен шрифт)

HLA на донора (D)	Антителен статус на реципиента (R)	Lumipex DSA кросмач	
		HLA клас I	HLA клас II
D1: HLA-A*03,*24; B*39,*40; DRB1*04,*11; DQB*03.	R1: Отрицателен за HLA-клас I и II	(-) отрицателен Score 1	(+) положителен Score 2 (фалшиво-положителен?)
D2: HLA-A*02,*30; B*13,*44,	R2: HLA – клас I (+) положителен	(+) положителен Score 3	(+) положителен

DRB1*07,*16; DQB*02,*05.	A1,2,3,11,24,26,29,30,31,33,34,36,43,66,68,80; B44,45,57,58,76,82; R2: HLA-клас II (-) отрицателен		Score 2 (фалшиво-положителен?)
D3: HLA-A*02,*30; B*13,*44, DRB1*07,*16; DQB*02,*05.	R3: HLA-клас I (-) отрицателен R3: HLA-клас II (+) положителен HLA-DR1,3,7,8,9,10,12,13,14,15,16; 51; DQ5,6, DQA, DP	(-) отрицателен Score 1	(+) положителен Score 2 (MFI = 1360)
D4: HLA-A*24,*32; B*18,*35, DRB1*11,*16; DQB*03,*05.	R4: HLA-клас I (-) отрицателен R4: HLA-клас II (+) положителен HLA-DR103,3,4,7,8,9,11,12,13,14,15,16;DR52,53; DQ2,6,8(3),9(3); DQA,DPB	(-) отрицателен Score 1	(+) положителен Score 3 (MFI = 5160)

При наличие на антитела срещу HLA клас I или II несъвместимите антигени на донора LumInex кросмачът е положителен (score=2-3), като реакциите са по-силни при наличие на DSA срещу повече от един несъвместим антиген, предимно от клас I, вкл. и такива от кръстосано реагиращи групи (CREG) – донор/реципиентните двойки D2/R2 (клас I); D3/R3 и D4/R4 (клас II). Получихме слабоположителни резултати (score=2) за HLA клас II донор-специфична реактивност при серум с липсващи HLA клас II антитела (D1/R1; D2/R2) (табл. 12).

Клиничното приложение беше оценено чрез сравняване на резултатите от LumXm и FCXM, проведени на 44 двойки донор/реципиент, разпределени в четири групи според резултата от FCXM (табл. 13).

Таблица 13. Разпределение на пациентите по групи

Група	FCXM		DSA		Автокросмач	
	Т-клетъчен	В-клетъчен	Клас I	Клас II	Т-клетъчен	В-клетъчен
1	(-) отр.	(-) отр.	(-) отр.	(-) отр.		
2a	(-) отр.	(+) пол.	(-) отр.	(+) пол.		
2b	(-) отр.	(+) пол.	(-) отр.	(-) отр.	(-) отр.	(+) пол.
3	(+) пол.	(-) отр.	(+) пол.	(-) отр.		
4	(+) пол.	(+) пол.	(+) пол.	(+) пол.		

Въз основа на нашия анализ установихме, че при всички случаи на положителен виртуален Т-клетъчен кросмач са открити HLA клас I DSA, т.е. положителната предиктивна стойност (PPV) е 100%, докато отрицателната предиктивна стойност (PNV) е 93,54%. Предиктивните стойности за В-клетъчния кросмач са по-ниски – PNV = 88,68%, PPV = 71,05%.

V. ОБСЪЖДАНЕ

В служебния регистър на ИАМН към декември 2023 г. има 787 реципиенти, чакащи бъбречна трансплантация. В световен мащаб се използват две основни стратегии за оценка на имунологичния риск преди бъбречна трансплантация:

1. Оценка на несъвместимост по HLA между донор и реципиент, което позволява в известна степен да се предскаже дали реципиентът ще синтезира *de novo* DSA в следтрансплантационния период;
2. Откриване и идентифициране на преформирани DSA в реципиента, които могат да доведат до тежка AMR и впоследствие – до загуба на присадка.

В контекста на посоченото като първа стъпка в настоящото проучване направихме детайлен анализ на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на пациентите, включени в регистъра на чакащите за БТ (n=600).

5.1. Демографски характеристики

Средната възраст на пациентите в нашия регистър е $48,66 \pm 10,86$ години (от 20 до 72 години). Възрастовият профил на пациентите в различните регистри варира. Данните на Евротрансплант за 2023 г. показват, че в регистъра на чакащите БТ преобладават пациенти между 16- и 56-годишна възраст (<https://www.eurotransplant.org>), докато във Великобритания повечето регистрирани са между 50 до 64 години [UK Renal Registry 21st Annual Report, 2019]. Няколко проучвания върху възрастовия диапазон в регистрите на различни страни показват сходни на нашите резултати – за Унгария се съобщава средна възраст от 47 години [Barth A, Szöllösi GJ и съав., 2021], за Полша – $50,62 \pm 20,64$, от които 35% под 50 години [Malyszko J, Dryl-Rydzynska T и съав., 2018] и за Турция – 53 ± 13 г. [Gizem Kumru Sahin, Sura Usta и съав., 2021]. Възрастта и времето на диализа увеличават риска от натрупване на сенсibiliзиращи фактори, а оттам – за образуване на алоантитела.

По отношение на разпределението по пол, мъжете преобладават в регистрите на чакащите БТ [Barth A, Szöllösi GJ и съав., 2021; Malyszko J, Dryl-Rydzynska T и съав., 2018; Gizem Kumru Sahin, Sura Usta и съав., 2021; Melk A, Babitsch B и съав., 2019; Fernandez-Prado R, Fernandez-Fernandez B и съав., 2018], каквито са и нашите данни. Освен това делът на мъжете в българския регистър е 59,8%, съответстващо на данните за Евротрансплант, където 61% от пациентите са мъже, и на ERA-EDTA (European Renal Association –European Dialysis and Transplant Association) регистъра (40% жени) [Melk A, Babitsch B и съав., 2019]. Обсъждат се различни причини за по-малкия дял на жените в регистрите на чакащи БТ – от социално-икономически до биологични фактори. Melk et al. [Melk A, Babitsch B и съав., 2019; Melk A, Schmidt BMW B и съав., 2020] подчертават, че социално-икономическите фактори (здравно осигуряване, семейно положение, финанси, образование и др.) са водещи за САЩ, но не и за европейски страни като напр. Франция и Шотландия, в които има универсално здравно осигуряване, но са докладвани подобни различия между двата пола при чакащите БТ [Couchoud C, Bayat S и съав., 2012; Oniscu GC, Schalkwijk AA и съав., 2003]. От биологичните фактори се обсъждат по-бавната прогресия на ХБН, по-малка честота на ТБН и по-малък риск от започване на диализа при жените в сравнение с мъжете с хронично бъбречно заболяване [Melk A, Babitsch B и съав., 2019; Silbiger SR и съав., 2011].

5.2. Клинични характеристики

Що се касае до рисковите фактори за ТБН, като водещи причини се съобщават диабетна нефропатия, хипертония и гломерулонефрит. Анализ на пациентите от листата на чакащите БТ на Медицински факултет на Университета в Анкара, Турция, определя хипертонията (28,4%), диабетната нефропатия (21,2%) и гломерулонефритът (15,3%) за най-честите причини за ТБН, а при 12% причината е неизвестна [Gizem Kumru Sahin, Sura Usta и съав., 2023]. Проучване върху 300 пациенти в списъка на чакащите БТ в Полша посочва като причина за ТБН хипертония и хроничен гломерулонефрит при 29% и диабетна нефропатия при 25% [Malyszko J, Dryl-Rydzynska T и съав., 2018]. Авторите подчертават, че диабетната нефропатия като рисков фактор за ТБН в САЩ е с почти два пъти по-голяма честота (43,2%) [Somnath Pal, US Pharm и съав., 2016] в сравнение с Полша. Трябва да се има предвид, че освен основна причина за ТБН, диабетът носи риск от други усложнения, включително сърдечно-съдови [Papaetis GS, Papakyriakou P и съав., 2015]. Интересно е да отбележим, че за разлика от посочените данни, диабетът като причина за бъбречно заболяването се наблюдава доста по-рядко в нашето проучване. При нас делът на пациентите с хроничен гломерулонефрит (27,2%) е съпоставим с този за Полша [Malyszko J, Dryl-Rydzynska T и съав., 2018] и малко по-висок от данните за Европа (приблизително 20%). Тези разлики в причините, довели до ТБН, може да се дължат на факта, че при нас процесът на диагностициране се забавя, което е и основната причина за високия процент недиагностицирани причини за ТБН (25,5%).

Нашето проучване демонстрира също така и че хипертонията, диабетът и сърдечно-съдовите заболявания са най-честите съпътстващи заболявания при пациентите в листата на чакащите БТ, което съответства на данните от други анализи [Gizem Kumru Sahin, Sura Usta и съав., 2018]. Трябва да отбележим, че пациентите с тумори в българския регистър на чакащите БТ са много малко – 2,4% (14/586). В достъпната ни литература данните за неоплазии сред чакащите бъбречна трансплантация са оскъдни. Нашите резултати корелират с проучване в Италия върху 1184 пациенти, изключени от листата на чакащите по клинични причини, при които се установява 2,2% обща честота на рак [Mosconi G, Centofanti F и съав., 2018]. Две по-скорошни проучвания в Полша съобщават за единични случаи на пациенти с история за неоплазии сред чакащите БТ в сравнение с болните на диализа, но анализът им е върху много малък брой пациенти от регистъра [Pyrza M, Malyszko J и съав., 2020, Pyrzya M, Glogowski T и съав., 2022]. Тази относително ниска честота може да се свърже с критериите за включване в регистрите, касаещи изключване на основни патологии, като неопластични заболявания. Уместно е да се отбележи, че честотата на злокачествени заболявания постепенно се увеличава в общата популация, което се наблюдава и при кандидатите за бъбречна трансплантация [Ban TH, Park WY и съав., 2019].

Средното време на чакане за пациентите е приблизително 8 години (91,6 месеца). В Турция то е около 5 години, в Канада – 2,1 години, в САЩ по-малко от 2 години [204 и съав., 2018]. Установеното за нашите пациенти по-дълго време на изчакване е свързано и с по-малкия брой трупни донори в България, както и с високия процент сенсibiliзирани реципиенти (средно 32,5%). Анализ на времето за изчакване за трансплантация в Обединеното кралство показва, че то се увеличава с нарастване на нивата на сенсibiliзация. За несенсибилизирани пациенти, регистрирани между юли

1998 г. и декември 2005 г., средното време на изчакване за трансплантация е 788 ± 26 дни, нараства на 1696 ± 213 дни за пациенти с ПРА от 61% до 84%, а за силно сенсibiliзирани пациенти е най-продължително – 2232 ± 773 дни [Fuggle SV, Martin S. и съав., 2008]. Sapir-Pichhadze et al. [Sapir-Pichhadze R, Tinckam KJ и съав., 2016] провеждат проучване върху 161 308 пациенти, чакащи за БТ, резултатите от което предполагат, че ПРА са независим предиктор и на смъртност при кандидатите за БТ в списъка на чакащите. Използваните от тях рискови модели за анализ показват, че тази връзка е независима от времето на диализата или тежестта на коморбидното заболяване. Авторите обсъждат предполагаеми механизми, чрез които анти-HLA антителата създават нарастващ риск от смъртност при сенсibiliзирани пациенти [Sapir-Pichhadze R, Tinckam KJ и съав., 2016].

Генерираните от настоящото проучване данни за демографския и клиничния профил на чакащите за БТ у нас може да се използват при разработване на здравни политики, касаещи най-уязвимите и рискови пациенти в регистъра. Това ще допринесе до намаляване на заболяемостта и смъртността на пациентите в регистъра, и ще подпомогне медицинските специалисти в областта на бъбречната трансплантация.

5.3. Имунологични характеристики

5.3.1. Алоимунен статус, сенсibiliзиращи събития

Като следваща стъпка анализирахме и характеризирахме имунния профил на чакащите бъбречна трансплантация пациенти чрез определяне на **алоимунния им статус**. Известно е, че наличните анти-HLA антитела преди трансплантация са независим предиктор за загуба на присадката и може да повлияят изхода от трансплантацията, като това зависи и от силата им. Ето защо алореактивният статус на реципиента е основен показател за определяне на имунологичния риск при бъбречна трансплантация. За да оценим алоимунния профил и т.нар. „серологична памет” на пациентите от регистъра, анализирахме изследваните чрез Lumineх технологията HLA антитела в серумите им. Нашият анализ от периодичните скрининги показва, че най-голям е дялът на пациентите с антитела срещу HLA клас I антигените (средно 38,2%), следвани от тези към клас II (26,35%), а най-малко са пациентите с антитела срещу двата класа (18,4%). Данните за разпределението на алоантителата според HLA класовете варират при реципиентите в различните листи на чакащите БТ и зависят от анализирания извадки и методи за изследване. Например, на базата на микросферови флоуцитометрични (FlowPRA) тестове Can и сътр. [Can Ö, Gökçe AM и съав., 2016] установяват при един от рутинните скрининги, че 31% и 35% от изследваните 140 реципиенти са положителни съответно за клас I и II антитела, а 19% имат антитела срещу двата класа антигени. Допълнително, над 50% от пациентите в анализирания от тези автори извадка са перманентно отрицателни за хуморална алореактивност, докато 22% от пациентите са перманентно положителни за HLA клас I и 15% за клас II антитела. Нашите резултати от рутинните скрининги показват, че около 60,0% от изследваните в рутинните скрининги пациенти остават отрицателни за HLA антитела, като дялът на перманентно положителните е средно 13,2% за клас I и 9,5% за клас II антитела. Наблюдаваните различия между нашите данни и тези на посочените автори може да се дължат на различни извадки, брой скрининги и микросферови технологии за детекция на алоантитела (FlowPRA vs. Lumineх). Други изследователи в ретроспективно проучване на 163

пациенти от листата им на чакащи БТ откриват чрез LumineX технологията наличие на HLA антитела в 36,20% от изследваните, но разпределението им по класове не е анализирано [Katalinić N, Starčević A и съав., 2017].

Логична следваща стъпка бе оценка на алоантителния статус в зависимост от данните за **сенсibiliзиращи събития**. При този анализ са взети в съображение както класическите сенсibiliзиращи събития (преливане на кръвни продукти, бременности/аборти, предходни трансплантации), така и други фактори, които могат да повлияят/допринесат за алосенсibiliзация. От класическите сенсibiliзиращи събития, свързани с положителни ПРА, установихме, че най-силен имунизиращ фактор е предходна трансплантация като самостоятелно събитие или в комбинация с други, следвана от бременност и кръвопреливане. Сходни са резултатите и от други проучвания [López Del Moral C и съав., 2022, Resse M, Paolillo R и съав., 2018], посочващи предходна трансплантация за най-честата причина за алосенсibiliзация, последвана от бременност и кръвопреливане. Нараства броят на пациентите, които се връщат на диализа след загуба на присадката. Съществуват доказателства, че повторната трансплантация намалява смъртността с до 45% [Bhaskaran MC, Heidt S и съав., 2022]. Пациентите, които се връщат на диализа след неуспешна БТ, често развиват антитела, което намалява шанса им за провеждане на втора трансплантация, която обикновено е от трупен донор. Включените в проучването ни пациенти, върнати на диализа след загуба на присадката, не са провели нефректомия на алографта. По литературни данни извършването ѝ води до алосенсibiliзация и образуване на донор-специфични антитела, чието клинично значение може да бъде подценено или надценено поради променливото им персистирание във времето [Bhaskaran MC, Heidt S и съав., 2022]. Проучване на Lucisano et al. [Bhaskaran MC, Heidt S и съав., 2022] доказва, че трансплантационната нефректомия, независимо кога е извършена, води до дългосрочно образуване на донор-специфични и недонорни антитела, които нарастват във времето, в сравнение с пациенти, които не са подложени на нефректомия на трансплантата. Според друго проучване на същия автор [Battle RK, Henderson L и съав., 2020] поддържането с ниска доза такролимус предотвратява развитието на алосенсibiliзация и може потенциално да увеличи шансовете за повторна трансплантация с HLA съвместим бъбрек.

Относно класическите сенсibiliзиращи събития при разглеждане на показателя **бременност** делът на жените със забременявания е по-голям сред положителните за алоантитела пациенти, като за клас I антителата разликата е значима при CDC скрининга. Макар и недостигащ статистическа сигнификантност, броят на забременявалите жени, положителни за антитела срещу HLA-A (69 vs. 18), -B (75 vs. 22) и -C (38 vs. 11) локусните антигени, е по-голям от този на незабременявалите, но трябва да се има предвид, че специфицирането е извършено с микросферови SAB тестове. По отношение на реактивността срещу HLA клас II специфичности, разликата между забременявали и незабременявали пациентки е статистически значима за антитела срещу DRB1 ($p = 0,007$) и DQA1 ($p = 0,004$) и несигнификантна, но с по-голям брой при жени с бременности (48 vs. 11) за DQB1. По време на бременността жената е изложена на сенсibiliзация с HLA антигените на нейния партньор, водещо до продуциране на антитела при 15-30% от бременните срещу унаследените от фетуса несъвместими HLA бащини антигени [Van Rood JJ, Eernisse JG и съав., 1958, Regan L, Braude PR и съав., 1991,

Densmore TL, Goodnough LT u съав., 1999]. Често срещана находка е значителното намаляване [*Payne, R. u съав., 1962, Nielsen HS, Witvliet MD u съав., 2010*] на тези антитела след раждането, като едно проучване предполага дори пълното им изчистване скоро след раждането [*Regan L, Braude PR u съав., 1991*]. Други автори предоставят доказателства, че ниско ниво на алореактивност може да продължи десетилетия след бременността [*Triulzi DJ, Kleinman S u съав., 2009, Middelburg RA, Porcelijn L u съав., 2011*]. В подкрепа на тези съобщения и на предишни наши данни [*Mihaylova A, Spassova P u съав., 2004*] са и резултатите от настоящото проучване за персистирането на алоантитела при забременявали жени от регистъра, без анамнеза за други сенсibiliзиращи събития. В този контекст трябва да се подчертае, че сенсibiliзацията в резултат на бременност може да бъде проблем, когато жената е в листата на чакащите БТ [*Pollack MS, Trimarchi HM u съав., 1999*], и това е една от основните причини за персистиращи HLA антитела в серумите на алоимунизирани потенциални реципиентки. По време на бременност жената може да е развила алоимунен отговор срещу HLA на бащата, който не се открива при регулярния алоантителен скрининг. Това потенциално прави партньора и/или техните деца неподходящи донори за майката поради риска от отхвърляне или кратък живот на присадката. От друга страна, по време на нормална бременност възниква двупосочна регулация по такъв начин, че имунната система на майката толерира наследените бащини антигени (РА), експресирани от плода, а развиващата се фетална имунна система толерира неунаследените майчини антигени (НИМА) [*Burlingham WJ, Benichou G u съав., 2012, Burt TD u съав., 2013*]. Алотолерансът в резултат на бременност в последните години се обсъжда като опция, която да се има предвид при избора на донор при трансплантация на хемопоеични стволови клетки.

Нашите резултати показват, че **кръвопреливането** е най-честото сенсibiliзиращо събитие, но самостоятелно не винаги индуцира синтез на алоантитела. Този сенсibiliзиращ фактор се установява над 2,5 пъти по-често при антитяло-негативните в сравнение с антитяло-позитивните пациенти с хемотрансфузия. Известни различия се наблюдават в индуцирането на антителен отговор срещу различните HLA локуси. Най-голям е процентът на индуцираните от кръвопреливане антитела срещу В-локусни (42,1%) и А-локусни (38,6%) антигени, около 25,0% срещу HLA-C, DRB1 и DQB1, 19,0% към HLA-DPB1, а най-малък – срещу HLA-DQA1 (10,6%). Според годишен доклад на United States Renal Data System пациенти с хемотрансфузии са с 2,38 пъти по-голяма вероятност за генериране на панел-реактивни антитела > 80%, в сравнение с тези, които никога не са трансфузирани с кръвни продукти [*U.S. Renal Data System, 2010*]. При анализ на резултатите за пациентите от регистъра установихме, че делът на хемотрансфузираните е сигнификантно по-голям в групата на положителните в сравнение с отрицателните за клас I ($p < 0,001$) и клас II ($p = 0,005$) алоантитела, което е в подкрепа на посочените данни. Според Gadde et al. [*Gadde, Ashwini B u съав., 2021*] многократното преливане на кръв/кръвни продукти води до по-голям риск от сенсibiliзация, докато еднократното кръвопреливане, като самостоятелно сенсibiliзиращо събитие, не е статистически значимо ($p = 0,244$). В нашето проучване 37,2% от кръвопреливаните пациенти с положителен алоантителен статус имат анамнеза за еднократна хемотрансфузия, 45,7% са с до 5 и 17,1% с над 5 кръвопреливания, като последните са и по-дълго време на хемодиализа. Наблюдаваната разлика с проучването на

Gadde et al. може да бъде резултат от различен брой пациенти само с едно кръвопреливане, но може да се дължи и на прилаганите кръвни продукти (напр. обезлеukoцитен еритроцитен концентрат в малко количество), както и на непълни данни от анамнезата. Важният извод, който може да направим, е, че преливането на кръв или кръвни продукти е практически единственото събитие, предизвикващо сенсibiliзация, което може да бъде контролирано и съответно предотвратимо. Следователно важно е да се избягва, освен ако не е абсолютно необходимо.

Относителният дял на мъжете е по-голям при отрицателните за алоантитела в сравнение с положителните ($p < 0.001$). В нашето проучване жените имат по-висока ПРА позитивност, както се вижда и в други проучвания [Gadde, Ashwini B и съав., 2021], което е очаквано, като се има предвид излагането им на чужди HLA през бременността. От друга страна, бременностите при пациентки в списъка на чакащите могат да настъпят само спорадично, което не обяснява наблюдаваното увеличаване на забременявалите жени с ПРА в хода на рутинните скрининги. Тази разлика по-скоро би могла да се обясни с бустериране от неспецифични стимулиращи събития на имунизации от предходна бременност.

Известно е, че проинфламаторни събития като ваксинации, хирургични интервенции, вирусни инфекции и др. могат да индуцират ресинтез на анти-HLA антитела, които не са били откривани при пациенти с анамнестични данни за алосенсibiliзация. Ето защо беше потърсена връзка между неklasически имунизирани събития и съответните алоантителни статуси. Считаме, че това допринася за по-голямата пълнота на разработката, защото не само класическите рискови фактори като известна причина за имунна сенсibiliзация срещу HLA антигени, могат да се отразят върху алоимунния профил на пациентите в листата на чакащите БТ.

През последните години интензивно се дискутира ролята на различни инфекции в генерирането на алоимунен отговор, но данните за този ефект са противоречиви. Много от съобщенията за развитието на HLA антитела след вирусни инфекции описват изолирани случаи, но големи контролирани и проспективни проучвания по темата липсват. Връзката между вирусните инфекции и последващия синтез на HLA антитела може да зависи от вида на патогена, независимо дали се касае за активна инфекция, или ваксинация, както и от дефиницията за положителни HLA антитела [Roelen DL, Doxiadis II и съавт., 2017]. D'Orsogna et al. [D'Orsogna LJ, Van den Heuvel H и съавт., 2017] описват различните механизми, чрез които излагането на патогени може да засили имунния отговор към алогенни HLA антигени. По-голямата част от данните за образуването на HLA антитела при вирусна инфекция или при ваксинация са в подкрепа на активиране на паметови В-клетки, с резултат разширяване на спектъра и увеличаване силата на HLA антителата. Вероятно инфекциите и ваксинациите могат да предизвикат анамнестичен В-клетъчен отговор при пресенсibiliзирани индивиди, но способността на инфекциите да предизвикват de novo ало-HLA-специфичен антителен синтез все още е дискуссионна и изисква допълнителни изследвания.

Добре известно е, че пациентите на хемодиализа са изложени на повишен риск от заразяване с вирусни инфекции, което се дължи основно на нарушения им клетъчен имунитет. Сред този контингент болни най-разпространените вирусни инфекции са хепатит В и хепатит С. Въвеждането на програми за ваксиниране и строгите мерки за

контрол на инфекциите успяха да ограничат разпространението на хепатитните инфекции в диализните центрове, но вирусни огнища продължават да възникват периодично и нивата на разпространение остават неприемливо високи. Анализът на 322 бази данни (795 623 случая) показва 7,32% общо разпространение на HBV инфекция сред пациенти на хемодиализа, като за Европа то е 7,07% [Khalesi Z, Razizadeh MH и съавт., 2023]. В нашата група делът на положителните за HBsAg е по-голям – 11,1% от 600 чакащи БТ и е съпоставим с този за Турция (13,3%) [Yakaryilmaz F, Gurbuz OA и съавт., 2006].

Разпространението на HCV инфекцията също варира значително сред пациентите на ХД от различни географски региони [Bernieh, B и съавт., 2015]. В Европа то е по-ниско на север (Англия – 2%, Швеция – 8,8%) и по-високо на юг (Испания – 25%, Италия – 27%, Турция – 30%) [Caragea DC, Mihailovici AR и съавт., 2018]. Докладваната анти-HCV серопозитивност при пациенти на ХД за Румъния е 14,43%, докато за Молдова и Босна и Херцеговина е 40% [Timofte D, Dragos D и съавт., 2020]. Някои колективи докладват за сигнификантна асоциация между HCV-позитивен статус и наличието на HLA клас I реактивност [Can Ö, Gökçe AM и съавт., 2016] или нивото на алоантителата [Gentil MA, Rocha JL и съавт., 1999, Forman JP, Tolloff-Rubin N и съавт., 2004]. За разлика от тези автори Özdemir и сътр. [Özdemir FN, Sezer S и съавт., 2000] не намират ефект на HCV инфекцията върху алоантителата при пациенти на хемодиализа. Öcal et al. провеждат ретроспективно кохортно проучване на данни от инфектирани с вируса на хепатит С диализиращи се пациенти, които са получили лечение с интерферон преди БТ, правейки преоценка на нивата на ПРА клас I и II с цел прогнозиране на устойчив вирусен отговор [Öcal S, Harmançl Ö и съавт., 2015]. Поддържането на вирусен отговор не корелира с положителността на ПРА клас I, но корелира с ПРА клас II. Изводът, който Öcal et al. Правят, е, че активирането на клетъчния имунитет може да доведе до изчистване на инфекцията с вируса на хепатит С, но и до синтез на високи нива на ПРА клас II.

В контекста на изложеното оценихме като независими прогностични фактори наличието на HBsAg и anti-HCV антителата при пациенти, очакващи БТ, и алоантителния им отговор. Установихме, че в хода на регулярното изследване на алоантителния статус носителите на хепатит са повече в групата на положителните за HLA клас I и/или клас II алоантитела. Тези данни са основание да предположим, че хепатитните вирусни инфекции може да се свържат с повишена вероятност от алоимунна реактивност/реактивация при пациентите в регистъра на чакащите БТ.

5.3.2. HLA специфичности на алоантителата

От съществено значение за коректна оценка на имунологичния риск при трансплантация е определянето на **HLA специфичностите на алоантителата**, даващи информация за неприемливите несъвместимости. При проследяване на пациентите, положителни за HLA-A локусни алоантитела, в рамките на една година се установи, че те се срещат средно в 75,6% от положителните проби за клас I. Най-честите антигенни специфичности (между 40% и 25%) в низходящ ред са HLA-A24, -A66, -A23 и -A25, -A2 и -A80. Относителният дял на положителните за HLA-B локусни алоантитела при регистрация и в рамките на трите скрининга е средно 81% от положителните проби за клас I. Най-често установяваните антигенни специфичности (между 40% и 30%) в низходящ

ред са срещу HLA-B49, -B57 и -B58, -B13, -B76, -B51, -B52 и -B77, -B53, -B27, -B44, -B63, -B7, -B47 и -B62. От положителните за HLA-C локусни алоантигени виждаме, че те се срещат средно в 51,5% от положителните проби за клас I, като най-честото антигено е срещу Cw9 (25,2%), следвано от Cw10 (22,7%) и Cw17 (22,4%). Антигено срещу HLA-DR локус се срещат при средно 64,5% от положителните през анализирания период проби за клас II и най-често срещаните (между 32% и 26%) са към HLA-DR4, -DR7, -DR9 и -DR10. Антигено срещу DQB1 локус се срещат средно при 67,4% от положителните проби за клас II, като най-честите (между 30% и 20%) DQ специфичности са DQ2, DQ6 и DQ5. Относителният дял на антигено срещу DQA1 и DPB1 през анализирания период е съответно 31,2% и 42,8%. От тях най-често срещани към DQA1 (между 15% и 20%) са DQA1*05:01, DQA1*03:01 и DQA1*01:01, а към DPB1 (между 15% и 25%) – DPB1*01:01, DPB1*05:01 и DPB1*17:01.

Уместно да се отбележи проучване в Турция, Башкент, което установява, че A2, A68, A23, B49, B37, B7, DR7, DR14, DR11, DQ9, DQ8 и DQ2 са най-често срещаните анти-HLA антигени с MFI>2000 [Baştürk B, Kantaroğlu B и съавт., 2016]. Видно е, че някои от антигеновите специфичности са с най-висока честота и в българския регистър (A2, A23, B49, B7, DR7, DQ2). Нашите анализи показват, че най-честите антигени не винаги са с най-силна реактивност (най-голям “score” или MFI). Сред HLA-A локусните антигени най-силна е реактивността не на най-често срещаното алоантигено HLA-A24, а на HLA-A2, което се установява с по-малка честота. Подобни са данните за HLA-DR антигеновите – антигеновите към DR9 показват най-високи стойности на положителни реакции (“score” = 8), а DR4, което е най-честото антигено е с най-ниски стойности („score” = 4). Докато сред HLA-B и DQ локусните антигени най-разпространените антигени са с най-висок процент силно положителни реакции – съответно HLA-B49 и DQ6, DQ5. Анти-HLA-Cw антигеновите са с най-ниските “score” стойности, което се приема като маркер за слаба имунна реактивност. Исторически, HLA-C антигеновите не са смятани за важен фактор за антигено-медирано отхвърляне (AMR), но понастоящем ролята им в хуморалната сенсibiliзация е призната [Duquesnoy RJ, Marrari M. и съавт., 2011]. Една причина може да се свърже със слабата експресия на тези молекули върху клетъчната повърхност [McCutcheon JA, Gumperz J и съавт., 1995]. Независимо от това, днес е установено, че HLA-C локусни антигени могат да индуцират антигенов отговор, подобен на индуцирания от другите, рутинно изследвани локуси [Falk K, Rotzschke O и съавт., 2016]. Клиничното значение на анти-HLA-C антигеновите при бъбречна трансплантация все още е неясно. Има съобщения за положителен флоуцитометричен кросмач в резултат на HLA-C DSA [Bachelet T, Couzi L и съавт., 2011], както и за асоциацията им с AMR [Aubert O, Bories MC и съавт., 2014, Bosch A, Llorente S и съавт., 2014]. Ето защо днес все повече трансплантационни центрове вземат в съображение наличието на преформирани HLA-C антигени за оценка на имунологичния риск и типизиране на донора по HLA-C (<https://etrl.org/InformationAM.aspx>).

Въпреки че първоначално вниманието беше фокусирано върху антигеновите срещу HLA-DR, все повече се приема, че HLA-DQ и HLA-DP антигеновите също са важни [Cross AR Lion J и съавт., 2016, Seney A, Lerut E, и съавт., 2019, Qiu J, Cai J и съавт., 2005]. През последните години се появиха публикации за връзката на HLA-DQ несъвместимостта

мостта не само с риска за развитие на de novo DSA, но и с риск от отхвърляне на присадката (включително ABMR и Т-клетъчно-медирано отхвърляне) [Senev A, Coemans M и съавт., 2020]. Kosmoliaptsis et al. [Kosmoliaptsis V, Gjorgjimajkoska O и съавт., 2014] доказват, че повече от 50% от пациенти, трансплантирани с несъвместимост по HLA-DQ, се превръщат в силно сенсibiliзирани при връщането им в листата на чакащи БТ. Този феномен не е така силно изразен при други HLA локусни несъвместимости. Според проучване, проведено от Tambur et al. [Tambur AR, Kosmoliaptsis V и съавт., 2021] тези антитела са най-често срещу донорните HLA-DQ антигени, водещи до повишена сенсibiliзация, измерена чрез ПРА. Част от тези пациенти са клинично подходящи за ретрансплантация, но при някои от тях ПРА са повишени [Schrezenmeier E, Lehner LJ и съавт., 2021], както отчитаме и ние при нашите пациенти.

Според проучване на Seitz et al. [Seitz A, Mounsey K и съавт., 2022] освен съществуващите предтрансплантационно антитела срещу DQ, трябва да се отчете и влиянието на HLA-DP DSA, които според авторите са високорискови за хронично антитяло-медирано отхвърляне. Първичното място на алоразпознаване е донорният ендотел, където експресията на HLA-DR обикновено е по-висока, но в резултат от възпалителни промени, вероятно индуцирани от интерферон- γ , нараства експресията на HLA-DQ и DP антигени. HLA-DP антигенът, също както и DQ, се състои от хетеродимер от 2 пептидни вериги – DP α и DP β , кодирани от съответно полиморфни DPA1 и DPB1 гени. Проведените популационни генетични изследвания доказаха силна неравновесна връзка между DPA1 и DPB1 [Hurley CK, Baxter-Lowe LA и съавт., 2000]. HLA-DP антителата все още не се прилагат при дефиниране на неприемливи антигени за определяне на съвместимост между донор и реципиент при органна трансплантация, тъй като се считаше, че те не повлияват изхода от трансплантацията. Но в литературата постоянно се увеличават данните за ролята на DP антителата, които могат да доведат до увреждане и ранна загуба на присадката от ABMR, което ги прави директно патогенни. Френско проучване, проведено от Daniëls et al. [Bachelet T, Martinez C и съавт., 2016], съобщава за 26 пациенти с DP DSA и повишен риск от положителен FCXM, ABMR и загуба на присадка в сравнение с несенсibiliзирани. Този риск е съизмерим с риска при реципиентите с DSA срещу локус HLA-A, HLA-B, HLA-DR и HLA-DQ. В ретроспективно проучване, проведено от Daniëls et al. [Daniëls L, Claas FHJ и съавт., 2020] с 13 сенсibiliзирани пациенти с предшестващи DP DSA, 6 от тях са имали ABMR, като трима са загубили присадките. При тези пациенти HLA-DP антителата с MFI под 10 000 са дали отрицателен CDC кросмач, най-вероятно резултат от по-ниските нива на експресия на HLA-DP антигени в сравнение с други HLA антигени. Изолирани HLA-DP DSA са редки, но представляват значителен риск за AMR. Дискусионен остава въпросът дали DP DSA са директно патогенни, или са маркер за повишена имунореактивност.

Въвеждането на твърдофазови анализи за откриване на HLA антитела и на лесно достъпни методи за молекулярно-генетично типизиране доведе до преценка както на ролята на HLA-DP антителата при бъбречна трансплантация, така и до използването им при определяне на неприемливи антигени [Seitz A, Mounsey K и съавт., 2022].

Известно е, че HLA специфичните антитела са насочени към специфичен епитоп върху HLA молекулата, съставени от триплети (еплети). Еплетът играе ключова

роля в това как антителата реагират с HLA молекулата. Алоимунната реактивност често е резултат от образуване на антитела, които разпознават не само имунизиращите антигени, но и множество други HLA антигени. Напр. антитяло, насочено срещу донорен HLA-B57 антиген, може да разпознае с голяма вероятност не само B57, но също така и A2, A23, A24, A68, A69, и B58 (които са част от същата кръстосано реагираща група като B57 – CREG2C). Разглеждайки нашите резултати, виждаме, че някои от най-честите алоантителни специфичности споделят общи епитопи – напр. HLA-A2, A23, A24, B57, B58, и са категоризирани в обща кръстосано реагираща група – CREG2C, което може отчасти да обясни по-голямата им честота.

В хода на скринингите наблюдавахме малки разлики в процентите на HLA специфичностите. Една от причините за това може би се дължи на факта, че с течение на времето промените в реактивността на алелите (MFI) може да е резултат от промяна на субкласовете IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), резултат от повишаване на афинитета или развитие на *de novo* антитела [Gu Y, Koh RWK и съавт., 2020]. В свое проучване Cornaby et al. [Cornaby C, Weimer ET и съавт., 2023] установяват, че за HLA клас I сферите показват свръхреактивност срещу A*29:01, A*29:02 и B*15:12 (B76). Докато клас II сферите, които показват според авторите фалшива реактивност, са срещу DRB3*02:02 (DR52), DPA1*02:01-DPB1*01:01, DPA1*02:02-DPB1*05:01, DQA1*05:05-DQB1*03:01, DRB1*04:01 и DRB1*04:03. Някои от посочените антителни специфичности се установяват във висок процент сред положителните серуми в нашите извадки, но за момента нямаме обективни доказателства, че това е свързано с фалшива реактивност на сферите. Shih et al. [Shih NR, Nong T и съавт., 2024] демонстрират, че реактивността на HLA клас II антитяло (DQβ06:03/DQα01:03) може да бъде повлияна от полиморфни пептиди, получени от HLA клас I протеини, свързани към HLA клас II пептид-свързващо място. Тези HLA клас I пептид-специфични епитопи са имуногенни и клинично значими. Преформирани или *de novo* DSA, насочени към HLA-DQ, а именно DQβ06:03/DQα01:03, са свързани с лоша прогноза при БТ. За отбелязване е, че в нашето проучване антителата към DQ6 и DQA1*01:01 са едни от най-често срещаните DQB1 и DQA1 антителни специфичности.

5.3.3. Динамика на алоимунната реактивност

Алоимунитетът е динамичен процес и като такъв алоимунният профил на отделен пациент може да се промени с времето. HLA антителата може да присъстват при регистрирането в списъка на чакащите или да се открият по време на престоя на пациентите в листата на чакащите в резултат на класически имунизационни събития, но и поради повишаване на преди това неоткриваеми имунизации от неспецифични провъзпалителни събития, като ваксинации и инфекции [Akgul SU, Ciftci HS и съавт., 2017, Katerinis I, Hadaya K и съавт., 2011, Locke JE, Zachary AA, и съавт., 2009, Brakemeier S, Schweiger B и съавт., 2012]. Текущият алоимунен статус на реципиента е съществен за оценка на имунологичния риск преди трансплантацията, което изисква да се следят и регистрират промени в него чрез анализ на анти-HLA антителата на регулярни интервали. Има малко проучвания за това как алоимунните отговори се променят с времето при пациенти в списъка на чакащите за трансплантация. Липсата на познания в тази област също беше подчертана в публикация на специалисти от Американското дружество за

тъканна съвместимост и имуногенетика (ASHI) и Американското дружество по трансплантация, обединени в работна група „Сенсибилизиране при трансплантация: Оценка на риска“ (STAR) [Tambur AR, Bestard O и съавт., 2023]. За да видим дали във времето има динамика в алоантителния статус на пациентите от българския регистър на чакащите бъбречна трансплантация, сравнихме алоантителния им профил при регистрация с резултатите от първи, втори и трети скрининг, както и между отделните скрининги. Това, което установяваме, е динамика, която може да бъде резултат от различната диагностична стойност на използваните техники за определяне на алоантитела. При първия скрининг е приложен лимфоцитотоксичен метод, използван проспективно като скринингов тест за откриване на преформирани цитотоксични антитела при пациенти, чакащи трансплантация. За съставянето на клетъчния панел са подбрани донори с възможно най-голямо разнообразие от HLA специфичности, характерни за нашата популация. Антитялото в серума трябва да бъде в достатъчно количество, за да може комплементът да се свърже здраво с Fc рецептора му, да се активира и да лизира клетъчната мембрана. При нискотитърни антитела тази връзка може да не се осъществи и антитялото да бъде пропуснато. Оценяването на процента мъртви клетки показва, че клетката експресира поне един HLA антиген, към който в серума на пациента има антитяло. Процентът ПРА на даден пациент съответства на неговата сенсибилизация. И точно тук идва недостатъкът на теста, защото, ако серумната проба, съдържаща антитяло срещу HLA-A1, се тества върху три различни по състав клетъчни панела, в които в съответния панел клетките на нито един, на половината или на всички донори експресират HLA-A1, отчетените ПРА ще бъдат правилно интерпретирани като 0%, 50% и 100%, съответно, но няма да отразяват реалния алоантителен статус на пациента. Затова клетъчните панели трябва по възможност да се съставят така, че да могат да се дефинират по-точно HLA специфичностите на антителата, което ще даде ценна информация за алоантителния статус на пациента, и от тук прогнозиране шанса му за трансплантация. Не трябва да се забравя и фактът, че всички тестове, базирани на клетки, като източник на антигени, са обект на фалшиво-положителни резултати, причинени от автоантитела и не-HLA антитела, както и фалшивоотрицателни резултати, когато антитялото е с много нисък титър, но е клинично значимо. С разработването и внедряването в рутинната практика на твърдофазовите тестове, при които чувствителността и специфичността са значително подобрени, стана възможно по-точно и обективно определяне на алоимунния статус на пациента. В последните години анализът на алоантителата с микросферови флуориметрични (Luminex) методи с единични антигени (SAB) се използва успешно за определяне на неприемливи за реципиента несъвместими антигени на потенциален донор. Предмет на дискусия остава клиничното значение на MFI в SAB анализите. Въпреки че няма консенсус относно клинично значимо MFI, повечето лаборатории считат $MFI \leq 1000$ за приемлива cut-off стойност за оценка риска преди трансплантация. Проучване, проведено от Schinstock et al. [Schinstock CA, Gandhi MJ и съавт., 2016], счита $MFI \leq 2000$ като отрицателен за техния център за БТ. Също така отбелязват, че най-много центрове за БТ използват MFI под 1000 за отрицателен при пациенти, които не са имали сенсибилизиращи събития. В друго проучване Gombos et al. [Gombos P, Opelz G и съавт., 2013] определят клинично значима стойност на $MFI \leq 3000$ за клас I и ≤ 5000 за клас II DSAs.

STAR работната група счита, че MFI между 1000 и 1500 може да се приеме като оптимална cut-off стойност за определяне на DSA и я препоръчва за унифициране на резултатите между различните центрове [Tambur AR, Bestard O и съавт., 2023]. За нашия трансплантационен център е приет MFI ≤ 1500 за несенсибилизирани и ≤ 1000 за сенсибилизирани. Прагът на MFI, използван за определяне на несъвместими антигени, може да бъде по-висок, за да се увеличи достъпът до органи, особено за кандидатите за сърце и бял дроб, поради липсата на възможности за живи донори и факта, че трансплантациите на сърце и бял дроб са животоспасяващи.

Но с новите технологии се появиха нови проблеми, свързани с прикачените върху микросферите HLA антигени. В резултат от процесите на денатуриране [Chowdhry M, Agrawal S и съавт., 2020], епитопи върху HLA молекулата (“cryptic”, скрити епитопи) могат да станат достъпни и да се свържат със серума на пациента (фалшиво положителни реакции). При настъпилите конформационни промени при изолиране на HLA протеините, някои антигенни епитопи могат да бъдат загубени (фалшивоотрицателни реакции). Предварителната киселинна обработка на пробите с iVaed разрешава проблеми, свързани с определянето на HLA клас I антигела срещу денатурирани антигени [Mishra VC, Raina V. и съавт., 2023]. Друго ограничение на SAB анализа е „прозона“ ефект. В повечето случаи е резултат от наличието на висока концентрация на антигелото (излишък), но може да бъде резултат от наличието на блокиращи антигела или неспецифични инхибитори, които присъстват в серума и пречат за откриване на специфично антигелото [Tambur AR, Kosmoliaptsis V и съавт., 2021]. Има множество обяснения за ефекта на прозона, включително насищане на микросферите, пространствена пречка от комплементния комплекс и наличието на IgM HLA-специфични антигела. Интерференцията на комплемента включва ковалентното му свързване и натрупване на C4 и C3 върху имунния комплекс, предотвратявайки по този начин свързването на детекционното анти-IgG антигелото с IgG алоантигелото. Един от възможните начини за отстраняването на проблема е използването на EDTA, която инхибира формирането на комплекса C1qrs и по този начин предотвратява активирането на комплемента [Schwaiger E, Wahrmann M и съавт., 2014]. Третирането на пробите с дитиотреитол води до разрушаване на пентамерната структурата на IgM и дисулфидните връзки в молекулите на комплемента, като по този начин намалява прозоновия ефект. Според някои автори предварителната обработка на серума с EDTA е най-ефикасният метод за елиминиране на прозоновия ефект [Kim HS, Choi AR и съавт., 2019], но това не винаги елиминира пълното въздействие на инхибирането, особено когато титрите на антигелата са високи [Tambur AR, Schinstock C и съавт., 2022].

„Споделени епитопи“ е друго ограничение в SAB тестването, което може да доведе до неправилно определени ниски стойности на MFI. Когато редица антигени споделят един и същ епитоп, антигелото се разпределя в епитоп-позитивните антигенни сфери, което води до намалени флуоресцентни сигнали, докато антигелата, насочени към уникален, специфичен епитоп, генерират специфичен флуоресцентен сигнал [Mishra VC, Chandra D и съавт., 2022]. Напълно възможно е при „споделени епитопи“ да има DSA с MFI < 1000 . Ето защо STAR групата акцентира върху необходимостта от познаването на споделените епитопи за правилната интерпретация на SAB анализите [Tambur AR, Bestard O и съавт., 2023].

Най-честото приложение на Lumineх анализите е идентифицирането на неприемливи HLA антигени, които трябва да се избягват при БТ, но това не означава непременно, че всички други HLA антигени биха били съвместими за пациента. Основните предимства на Lumineх метода са висока специфичност и чувствителност, количествено определяне (MFI), възможност за мултиплексен анализ и автоматизация. HLA формулата на пациента трябва да се има предвид при определяне на граничната стойност на MFI при наличие на висок фон. HLA типът на донора се използва за определяне на донор-специфични антитела. При силно сенсibiliзираните пациенти е необходимо типизиране с висока разграничителна способност на реципиент и донор за точно дефиниране алелните специфичности на някои антитела. Мониторинг на алоимунния статус чрез използване на съвременните SAB технологии в комбинация с разширено HLA типизиране значително подобряват способността ни да предсказваме имунологичния риск, свързан с бъбречна трансплантация за индивидуална двойка донор-реципиент [Kamburova EG, Wisse BW и съавт., 2018, Wehmeier C, Hönger G и съавт., 2017, Amico P, Hirt-Minkowski P и съавт., 2011].

5.3.4. Вероятност за несъвместими донори

Процентът на панел-реактивни антитела, т.е. процентът HLA антигени, реагиращи със серума на пациента, представлява т. нар. „трансплантационен индекс“ на пациента. Висок %PRA (> 80%) предполага, че кросмач реакцията на реципиента ще бъде положителна с 4 от 5 донора. Така, колкото по-висока е стойността на PRA, толкова по-голяма е вероятността от положителен кросмач със случайни донори и толкова по-малка е вероятността да се осъществи трансплантация. Поради това че процентът ПРА зависи от състава на панела от HLA специфичности, срещу които се тестват серумите, той не винаги отразява честотата на даден антиген в донорната популация. За преодоляване на този проблем са въведени т.нар. калкулирани PRA (cPRA). Този подход е разработен и внедрен в САЩ [Secka JM, Kucheryavaya AY и съавт., 2010], а по-късно приет и от други центрове, като UNOS, UK, Eurotransplant. Изчисляването на cPRA се базира на калкулиране на реакционната честота на неприемливите несъвместимости за даден пациент спрямо панел от много голям брой трупни донори за съответната страна или трансплантационен център. Така cPRA предоставят цифрово измерение на шанса за даден пациент да се намери съвместим трупен донор. Изчисляването на cPRA значително се улесни с въвеждане в рутинната практика на микросферните методи и особено на тестовете с единични антигени. Ето защо в настоящото проучване ние направихме опит да оценим **вероятностите за несъвместими донори** по определени HLA антигени, като съпоставихме разпределението на HLA специфичностите в контролна група от здрави индивиди [Ivanova M, Rozemuller E и съавт., 2002, Наумова Е, Иванова М., 2006] и група от трупни донори с тези на алоантителата при пациентите. Резултатите показаха, че шансовете за наличие на повечето HLA специфичности в контролната и донорската група са по-ниски, но за някои са увеличени в сравнение с антителните им аналози в групата на пациентите. Прави впечатление, че изчислените вероятности за несъвместим донор за пациентите при някои антителни специфичности са различни за контролната и донорската група поради различната честота на HLA антигените в двете групи. Например пациенти с антитела срещу HLA-A2 са с най-голяма вероятност (99%) да имат несъвместим по този антиген донор от

контролната група, докато за донорската група вероятността е 42,6%. Освен това пациенти с антитела, които се откриват с еднаква вероятност при пациентите (напр. срещу HLA-B51 и B52), имат различен шанс за несъвместим донор (78,7% за B51 и десетократно по-малък – 7,5%, за B52) от донорската група. Данните за здравите индивиди показват почти същия шанс за HLA-B52 (6,4%), но по-малка вероятност за HLA-B51 (32,7%) в сравнение с донорите, докато вероятността за донори, несъвместими по HLA-B57, за пациенти с антитела към тази специфичност е еднаква (5,5%) за донорската и контролната група. Според Tambur et al., ако се вземат в съображение и антигените, споделящи общи епитопи с HLA-B57, cPRA UNOS, калкулаторът ще генерира до 75% несъвместими по HLA-B57 потенциални донори, при два пъти по-висока честота (7%) на антигена в донорската им популация в сравнение с нашата (3,5%) [Tambur AR, Kosmoliaptsis V и съавт., 2021]. Трябва да се отбележи, че cPRA се влияят от наличието на антитяло и характеристиките на HLA в групата донори. Антителата срещу HLA антигени с високо разпространение имат много по-голямо влияние върху cPRA. Например наличието на ниско ниво на антитяло само срещу A2 ще определи за този индивид cPRA от 48%, докато пациентът може да има много високо количество антитяло срещу B39 и да има cPRA само 5% [Tambur AR, Schinstock C и съавт., 2021]. Нашите данни за вероятностите за несъвместим донор са в унисон с констатациите на споменатите автори за cPRA.

Резултатите от настоящото проучване могат да намерят приложение в рутинната практика и да послужат като първа стъпка за въвеждане на cPRA и за нашите пациенти. Такъв подход е особено важен при силно сенсibiliзираните реципиенти и ще повиши възможностите им за трансплантация.

Уместно е да отбележим, че шансът силно сенсibiliзираните пациенти да бъдат трансплантирани може да се увеличи и чрез добавяне на приемливи антигени (т.е. антигени, срещу които индивидът никога не е имал синтезирани антитела) към неговия HLA фенотип, като по този начин се създава „разширен“ HLA фенотип, въз основа на което да се проведе търсене на съвместим донор [Bhaskaran MC, Heidt S и съавт., 2022].

5.4. Кросмач реакция

5.4.1. FCXM

Още през 1969 г., Patel и Terasaki доказват, че свръхострата реакция на отхвърляне на алоприсадката може да бъде причинена от наличието на преформирани DSA и оттогава претрансплантационният кросмач става задължително изискване при бъбречна трансплантация, а положителен цитотоксичен кросмач абсолютно противопоказание за трансплантация. Днес свръхострото отхвърляне е рядко настъпващо състояние след въвеждането на предтрансплантационен FCXM, който позволява откриване на ниско титърни и на нефиксиращи компоненти DSA. Най-важният технологичен напредък, позволяващ актуалният кросмач да бъде потенциално заменен с виртуален кросмач, е разработването на високоспецифични и сензитивни микросферови тестове за детекция и специфициране на HLA антитела. Така на базата на алоантителния профил на пациента спрямо несъвместимите HLA антигени на донора днес много трансплантационни центрове извършват виртуален кросмач (V-XM) за бърза оценка на

имунологичната съвместимост с цел ускоряване и опростяване на претрансплантационния подбор.

Нашите анализите показаха, че при 97,42% от пациентите с отрицателен алоантителен статус или наличие на не-DSA резултатите от кросмача са отрицателни. При 79,3% от пациентите с преформирани антитела срещу несъвместимите донорни HLA клас I антигени очакваният T(+)/B(+) кросмач се потвърждава с резултатите от актуалния кросмач. В останалите случаи с наличие на DSA се установява при 6,89% T(+)/B(-) и при 10,3% T(-)/B(+) кросмач. Тези резултати са логични, като се има предвид, че HLA клас I експресията е по-силна върху В-клетките в сравнение с Т-клетките при живи донори, но при трупни донори варира и зависи от източника на клетки (периферна кръв, слезка или лимфен възел) [Arnold ML, Ensminger S и съавт., 2008, Ho S, Peiter C и съавт., 2017]. На практика, ако сумираме тези данни, ще получим 96,49% съпадения от предполагаемия с реалния кросмач. При наличие само на HLA клас II антидонорни антитела, реактивността както се очакваше е само срещу В-клетките – T(-)/B(+) кросмач. В настоящото проучване 2,58% от кросмач реакциите показаха положителни резултати, несъответстващи на алоантителния профил, въз основа на който V-ХМ би следвало да се оцени като отрицателен. Оформи се три комбинации от актуална кросмач реактивност: положителен Т- и В-клетъчен; отрицателен Т- и положителен В-клетъчен; положителен Т- и отрицателен В-клетъчен кросмач. За изясняване на тези находки извършихме допълнителни изследвания и анализи, включващи типизиране по HLA-C, DP, DQA локуси, типизиране на алелно ниво и допълнително тестване на серумите за антитела към тези локуси и/или алели.

В групата с неочакван T(+)/B(+) кросмач интерес представлява един от пациентите с нула несъвместимост по HLA-A, B, DR, DQ алелните групи. Причината за тази реактивност може да се свърже с наличие на алоантитела срещу алелни несъвместимости. Макар че положителен кросмач в резултат на алел-специфични антидонорни антитела се наблюдава по-рядко [Baxter-Lowe LA, Cecka M и съавт., 2014], тези алоантитела могат да бъдат клинично значими [Lomago J, Jelenik L и съавт., 2010]. При нашия пациент чрез NGS типизиране се установи несъвместимост по HLA-B35 алелите, но алел-специфични антитела не можах да се докажат, вероятно поради липса на несъвместимия алел в SAB теста. Допълнителните изследвания показаха наличие на донор-специфични антитела срещу HLA-DP локуса (HLA-DP*05). Положителен В-клетъчен кросмач поради HLA-DP DSA съобщават и други автори [Song SH, Park BG и съавт., 2016, Simmons DP, Kafetzi ML и съавт., 2016] при липса на несъвместимост по останалите изследвани локуси [Vaidya S, Hilson B и съавт., 2007]. HLA-DP типизирането не се извършва рутинно при бъбречна трансплантация поради ниската експресия на тези протеини върху бъбречния ендотел и слабата им имуногенност [Muczynski KA, Ekle DM и съавт., 2003]. Преоценката на значението на тези антитела в последните години показва, че HLA-DP DSA при положителен В-клетъчен FCXM са също толкова релевантни за антияло-медирано отхвърляне, като тези срещу HLA-A, B, DR или DQ [Bachelet T, Martinez C и съавт., 2016] и трябва да се вземат в съображение при оценка на съвместимостта. Ето защо при наличие на HLA-DP антитела резултатът от кросмача не може да се предвиди, ако донорът не е типизиран по този локус. При друг пациент от тази група с отрицателен алоантителен статус до момента на кросмач изследването, впоследствие

в актуалния серум бяха доказани DSA с много нисък MFI=624 към несъвместимия HLA-B18 антиген. Липсата на детектабилни алоантитела преди извършване на кросмач реакцията, независимо от многократните хемотрансфузии при този пациент, би могла да се дължи на реално липсващи такива, но не могат да се изключат и фалшиво негативни резултати. Съгласно политиката ни отрицателни серуми на реципиенти от регистъра на чакащите БТ не се съхраняват дългосрочно. Поради това не беше възможно да се направят допълнителни изследвания за прозonen ефект, интерфериране на комплемента и др. за изясняване на причината за посочените резултати.

Втората група реципиенти се характеризира с неочаквано T(-)/V(+) проспективен кросмач. Обикновено такива необичайни резултати могат да се наблюдават при автоимунни болести поради свързване на автоантитела или имунни комплекси към Fc рецепторите, които се експресират по-силно върху В-клетките [Althaf MM, El Kossi M и съавт., 2017]. Поради факта че положителен кросмач в резултат на автоантитела не е противопоказание за трансплантация, с извършването на автокросмач в тези случаи може да се установи или отхвърли автореактивност. Автокросмач тестът позволи да се отхвърли алореактивност и една от пациентките в тази група да бъде успешно трансплантирана. В групата с положителен автокросмач трябва да се отбележи пациент с прекарана вирусна инфекция (грип) около месец преди изследването, което може да бъде причина за положителния В-клетъчен кросмач и автокросмач. Доказано е, че адювантна ваксина срещу грип H1N1 е свързана с развитието на алоантитела [Brakemeier S, Schweiger B и съавт., 2012, Katerinis I, Hadaya K и съавт., 2011]. При трима от пациентите с T(-)/V(+) кросмач не можахме да докажем автореактивност, като при една от пациентките автокросмачът беше отрицателен с трима трупни донори. За съжаление, причините за тези резултати не можахме да бъдат изяснени. При две пациентки с лупусна нефропатия, при които не е правен автокросмач, може да се предположи, че T(-)/V(+) кросмач се дължи на автоантитела.

Третата група е от реципиенти с неочакван T(+)/V(-) кросмач, за който се приема че най-вероятно се дължи на не-HLA антитела. Нашите резултати обаче показваха наличие на донор-специфични антитела в пресния серум срещу HLA клас I антигени (към В-локусни при трима и А-локусни при двама реципиенти). Подобни са резултатите на Putheti et al. [Putheti P, Sharma VK и съавт., 2022] от анализа на 3073 клинични FCXM теста, според които почти 10% от T(+) FCXM тестове са отрицателни за В-клетъчна реактивност. Авторите доказват, че IgG антитела срещу HLA-A, -B и/или -C локусни антигени са свързани с T(+)/V(-) резултат. Като потенциални фактори, допринасящи за изненадващия T(+)/V(-) FCXM резултат, те посочват различната експресия на HLA върху Т- и В-лимфоцитите и/или диференцирано свързване на антителата към Т- и В-клетките, както и контролните серуми, които се използват за квалифициране на кросмача като положителен или отрицателен. Според нас тази реактивност е необичайна, като се има предвид, че HLA клас I антигените се експресират по-силно върху В-клетките. Друго обяснение може да бъде повишаване на фона поради свързване на детекционното антитяло с повърхностните имуноглобулини върху В-клетките, водещо до негативни стойностите за В-клетъчния кросмач. За повишаване чувствителността и специфичността на В-клетъчния флоуцитометричен кросмач се препоръчва [Schivano T, Montagner J и съавт., 2023] и все по-често се прилага обработка на клетките с проназа,

което сигнификантно намалява експресията на капа-леките вериги и Fc рецепторите (CD32b) върху В-клетките [Apithy MJ, Desoutter J и съавт., 2017]. Това обаче удължава технологичното време за извършване на теста и не винаги е обосновано при трансплантация от трупен донор. Трябва да се отбележи също, че такова третиране може да доведе до погрешни резултати като фалшивоотрицателен флоуцитометричен кросмач, поради редукция на експресията главно на HLA клас I молекули [Hetrick SJ, Schillinger KP и съавт., 2011] или фалшивоположителен Т-клетъчен FCXM, в резултат на разкриване на скрити епитопи и разпознаването им от специфични автоантитела [Szewczyk K, Barrios K и съавт., 2016]. Нашите резултати потвърждават, че неочаквано положителен Т- при отрицателен В-клетъчен кросмач може да се дължи на алоантителна реактивност, особено при пациенти с анамнестични данни за сенсibiliзиращи събития, което се съобщава и от други автори [Balgansuren G, Clark A и съавт., 2012, Putheti P, Sharma VK и съавт., 2022]. За подпомагане на клиничната интерпретация на такива находки би могло да се направи автокросмач, както при един от нашите реципиенти, с което да се изключи Т-клетъчна автореактивност.

При кросмач теста донорните лимфоцити са източник на донорни антигени и при положителен резултат се предполага, че у пациента присъстват циркулиращи алоантитела с потенциала да се свържат с несъвместимите антигени на трансплантирания бъбрек, да активират комплемента и да доведат до свръхостро или акселерирано отхвърляне. Както е известно, Т-клетките експресират HLA клас I, а В-клетките и двата класа. Положителният резултат за Т-клетки предполага вероятност за наличие на антитела срещу HLA клас I и е абсолютна контраиндикация за трансплантация, особено ако тестът е CDC. Положителният резултат за В-клетки предполага вероятност за наличие на антитела, както срещу HLA клас I, така и срещу клас II. Когато има резултат, отрицателен за Т-клетки и положителен за В-клетки, се предполага наличието само на клас II реактивност. Рядко не-HLA антителата водят до положителен резултат. Mishra et al. [Mishra VC, Dinesh C и съавт., 2022, Chowdhry M, Agrawal S и съавт., 2020] представят случай на пациент с положителен SAB клас I и отрицателен CDC и FCXM. Фалшивоположителни или високи титри на алоантитела могат да бъдат докладвани поради наличието на антитела срещу денатурирани HLA антигени в твърдофазовите тестове. Schinstock et al. предлагат начин, по който тези антитела да бъдат определени, а именно чрез третиране на серума на реципиента с киселина. SAB остава положителен и титрите нарастват, тогава определеното като донор-специфично антитяло е към денатуриран HLA антиген и според класификацията на риска от антитяло-медирано отхвърляне въз основа на комбинация от SAB и FCXM рискът за развитие на AMR ще бъде „нисък“ [Schinstock CA, Gandhi MJ и съавт., 2016].

Нашите данни показват, че резултатите от кросмач реакцията могат да бъдат предсказани в голяма степен на базата на рутинния претрансплантационен алоантителен скрининг и определяне на неприемливите HLA несъвместимости. Независимо от това в рутинната практика могат да се наблюдават неочаквани и необясними положителни резултати от FCXM, причините за които трябва да бъдат изяснени и внимателно интерпретирани при всеки пациент. Те може да се припишат на донор-специфични HLA антитела, които установихме в почти половината от случаите в нашето проучване. Наличието на автоантитела също трябва да се изключи, което сме направили

чрез автокросмач при нашите пациенти. Трябва да се отбележи, че някои от причините за неочаквано положителни резултати от кросмача остават под въпрос, поради това че не винаги могат да бъдат изяснени [Morris AB, Sullivan HC и съавт., 2019]. В доста трансплантационни центрове, включително и според нашата политика, позитивен FCXM (Т и/или В) е противопоказание за трансплантация. Клиничното значение на такава непродвидимата положителна кросмач реактивност трябва да бъде обсъдено с клиницистите с оглед по-пълна оценка на имунологичния риск, обективен и ефективен подбор на най-подходящите донор/реципиентни двойки и оптимизиране на следтрансплантационните резултати.

5.4.2. Микросферова технология за оценка на кросмач реактивността (LumXm)

Стратегията за кръстосано съвпадение трябва да дефинира имунологичния риск чрез разграничаване на увреждащите присадката антители. Въпреки че флоуцитометричният кросмач е по-чувствителен, автоматизиран и полуколичествен, фалшивите положителни резултати са често срещани за този клетъчно-базиран XM анализ. Технологията LumInex революционизира откриване на анти-HLA антители. Логично бе разработването на микросферова технология/ките за оценка и на кросмач реактивността (LumXm, LumInex DSA). LumXm се състои в елуиране на HLA молекули от лимфоцити на донора и свързването им с флуоресцентно маркирани сфери, които се инкубират със серума на реципиента. HLA DSA се откриват с помощта на второ флуоресцентно маркирано анти тяло.

Поради несъответстващи на алоантителния статус резултати от FCXM, една от задачите на настоящото проучване бе да се определят ползите от използването на LumXm в алгоритъм за бъбречна трансплантация. В съответствие с това въведохме микросферов кросмач тест и оценихме възможностите му за откриване на донор-специфична HLA реактивност. Резултатите от LumXm бяха съпоставени с тези от SAB тестовете за алоантитела, както и от FCXM. Нашите предварителни данни показват, че резултатите от LumXM са съпоставими с тези от алоантителата и FCXM при високи титри на антителата. Според Guillaume et al. [Guillaume N, Mazouz H и съавт., 2013], въпреки че LumXm може да открие клас I DSA (анти-A и анти-B) с MFI до 2300, анализът има „сива зона“ за MFI до 4000 с чувствителност от 54% и специфичност от 100%. По отношение на клас II DSA LumXm може да открие анти-DRB1 реактивност с MFI до 1300, чувствителност 93% и специфичност 99%. Нашата констатация за отрицателен LumXm при индивиди с положителни HLA клас I DSA с нисък титър (нисък MFI) и положителен Т-клетъчен FCXM е в съответствие с данните на Guillame et al. [Guillaume N, Mazouz H и съавт., 2013].

Нашите данни показват, че при пациенти с Т(-)/В(+) FCXM и Т(-)/В(-) авто-FCXM, но отрицателни за DSA, с този тест се потвърждава липсата на донор-специфична реактивност. Тестът е обективен, до известна степен автоматизиран, не изисква витални клетки, извършването му е в рамките на 3-4 часа (съпоставимо с времето за изработването на FCXM), но независимо от тези предимства има и някои ограничения. Едно от тях са наблюдаваните от нас фалшивоположителни HLA клас II DSA реакции, които са слаби (с по-малък “score”). Освен това установихме липса на HLA клас I реактивност при наличие на нискотитърни DSA от SAB тестването, но положителен Т-

клетъчен кросмач. Трябва да отбележим, че сме използвали замразени донорни дачни лимфоцити, а не замразени лизати, което също може да окаже влияние върху реактивността. Данните от литературата за възможностите и приложимостта на LumInex DSA теста в пре- и следтрансплантационния период са противоречиви. Billen et al. [Chowdhry M, Makroo RN и съавт., 2018] установяват, че чувствителността на LumXm е 96% за HLA клас I и 65% за HLA клас II, а специфичността му е 100% за HLA клас I и 97% за HLA клас II. Според тях HLA клас I LumXm се оказва по-чувствителен от FCXM. Тези автори отбелязват, че тестът открива HLA-DR антителата, но детекцията на HLA-DQ и DP антителни специфичности е съмнителна или липсва. Chowdhry et al. [Mishra MN, Lal V и съавт., 2016] също установяват, че LumXm е отрицателен при наличие само на HLA-DQ DSA антитела или HLA-DQ в комбинация с HLA клас I или с други клас II специфичности. В допълнение, с LumXm теста освен HLA-DQ и DP не могат да се открият антитела срещу HLA-C локусните антигени. Guillaume et al. изказват предположението, че HLA-C, -DP и -DQ антигените не се улавят ефективно от LumXm сферите и следователно антитела срещу антигени, принадлежащи към тези локуси, не се откриват [Guillaume N, Mazouz H и съавт., 2013].

Редица автори [Chowdhry M, Makroo RN и съавт., 2018, Mishra MN, Lal V и съавт., 2016, Chacko MP, Augustin A и съавт., 2019] съобщават, че фалшивоположителна за HLA клас II DSA реактивност се наблюдава често при LumXM технологията, каквато установихме и ние. За да се изключи неспецифичен положителен резултат, дължащ се на не-HLA антитела, Guillaume et al. [Guillaume N, Mazouz H и съавт., 2013] препоръчват авто-LumXM. В опит да си обясним неочакваната слаба HLA клас II реактивност в микросферовия кросмач при негативен за алоантитела пациент, но с T(-)/B(+) FCXM и T(-)/B(+) авто-FCXM, ние също извършихме LumInex клас II автокросмач, който показва положителен резултат. Фалшивоположителните резултати могат да се обяснят с неспецифично свързване на не-HLA антитела и други серумни протеини (при инфекции, автоимунни болести, IVIg) към епитопи на таргетните микросфери или на моноклоналните антитела, с които се улавят HLA антигените, което да доведе до висока фоновата флуоресценция, като има различия в зависимост от партидата на кита [Chacko MP, Augustin A и съавт., 2019].

В ретроспективно проучване при пациенти със сърдечна трансплантация Chaidaroglou et al. [Chaidaroglou A, Skoura A и съавт., 2008] установяват добра съпоставимост между SAB и FCXM, но не и между тях и LumXM, както и ниска възпроизводимост на микросферовия кросмач тест. След изключване на случаите с положителен LumInex автокросмач и фалшивоположителни DSA, Guillaume et al. намират корелация между резултатите от LumXm клас I с тези от SAB анализа за 83% от комбинациите реципиент-донор и за над 97% при тези за клас II [Guillaume N, Mazouz H и съавт., 2013]. Нашите данни са в подкрепа на констатациите, че LumXm показва някои несъответствия с резултатите от SAB анализа, особено за антитела с нисък MFI. Установените от нас съответствия/несъответствия между LumXm, SAB и FCXM тестовете са съпоставими с тези на Ateur et al. [Ateur RF, Berkani LM и съавт., 2023]. Това, което със сигурност може да се каже, е, че LumXm не може да се използва самостоятелно като тест, а е необходимо да се комбинира с други техники – SAB тест и FCXM. Считаме също за

необходимо изработване на собствени критерии за дефиниране на положителни и отрицателни резултати от този тест.

В светлината на описаните наблюдения нашите резултати при Luminex кросмач теста са в съответствие с литературните данни и могат да бъдат обяснени. Независимо от ограниченията, LumXM може да даде полезна допълнителна информация за оценка на съвместимостта при живи донори за бъбречна трансплантация, но трябва да се интерпретира внимателно, заедно с алоантителния профил от SAB тестовете, класа на алоантителата, резултатите от FCXM и клиничния статус на реципиента, а не самостоятелно. Поради това че не изисква живи клетки, той може да намери приложение за оценка на хуморалния алоимунния отговор и при трансплантирани пациенти, особено в случаите, когато имunosупресивната терапия може да интерферира с FCXM теста. Поради ограничените ни данни и недостатъчен опит с Luminex кросмач теста считаме, че все още не е уместно да бъде включен в прогностичния ни модел за оценка на тъканната съвместимост.

5.4.3. Виртуален кросмач

Около 32,5% от пациентите в регистъра за чакащи БТ са сенсibiliзирани, т.е. имат преформирани HLA антители. В последните години широко клинично приложение намира виртуалният кросмач, позволяващ оценка на имунологичната съвместимост на базата на алоантителния профил на реципиента и HLA антигените на донора. Реално V-XM се използва за оценка на риска преди трансплантация. До момента няма консенсус относно целта на V-XM, дали оценката на риска включва прогнозиране на резултатите от реален кросмач или изхода от трансплантацията [Bhaskaran MC, Heidt S и съавт., 2022]. За несенсибилизирани пациенти, които нямат сенсibiliзиращи събития, като кръвопреливане, бременност и предходна трансплантация, нямат алоантитела, кросмач реакцията, проведена с всеки донор, би следвало да бъде отрицателна и за двата класа. Такъв сценарий е приложим за по-голямата част от пациентите в списъка на чакащите. За тези, които имат антители, доказани чрез SAB анализ, рискът варира в зависимост от граничните стойности на MFI, определящи дали антиятлото е приемливо, или неприемливо, или за прогнозиране на резултати от FCXM или CDCXM.

Norin et al. [Norin AJ, Das B и съавт., 2022] демонстрират изключително ефективен метод, който използват за прогнозиране на резултат от кросмач, прилагайки еплетния анализ и SAB MFI данните (Eplet/SAB calculation). Постигната е почти 100% корелация с ECXM резултатите при граница от 11 000 MFI, получена от сумиране на еплет положителните SABs, а не от микросферите, реагирали само с донорните HLA. В съображение се взема „феноменът на споделен еплет“, водещ до недостатъчно представяне на силата на антиятлото или пълна липса на специфичност, поради свързване на антиятлото към конкуриращи се таргети/еплети върху множество антигенни сфери, ефективно „разреждайки“ полученото MFI [Garcia-Sanchez C, Usenko CY и съавт., 2020]. Сумирайки MFI на всички потенциални положителни донорни еплети с останалите положително реагирали сфери и ако стойността на MFI е над 11 000, Norin et al. прогнозираят положителен кросмач и антигените, експресиращи еплета, стават неприемливи. Ако MFI стойността е под 11 000, антигените, експресиращи еплета, няма да бъдат неприемливи, а реалният кросмач вероятно ще бъде отрицателен.

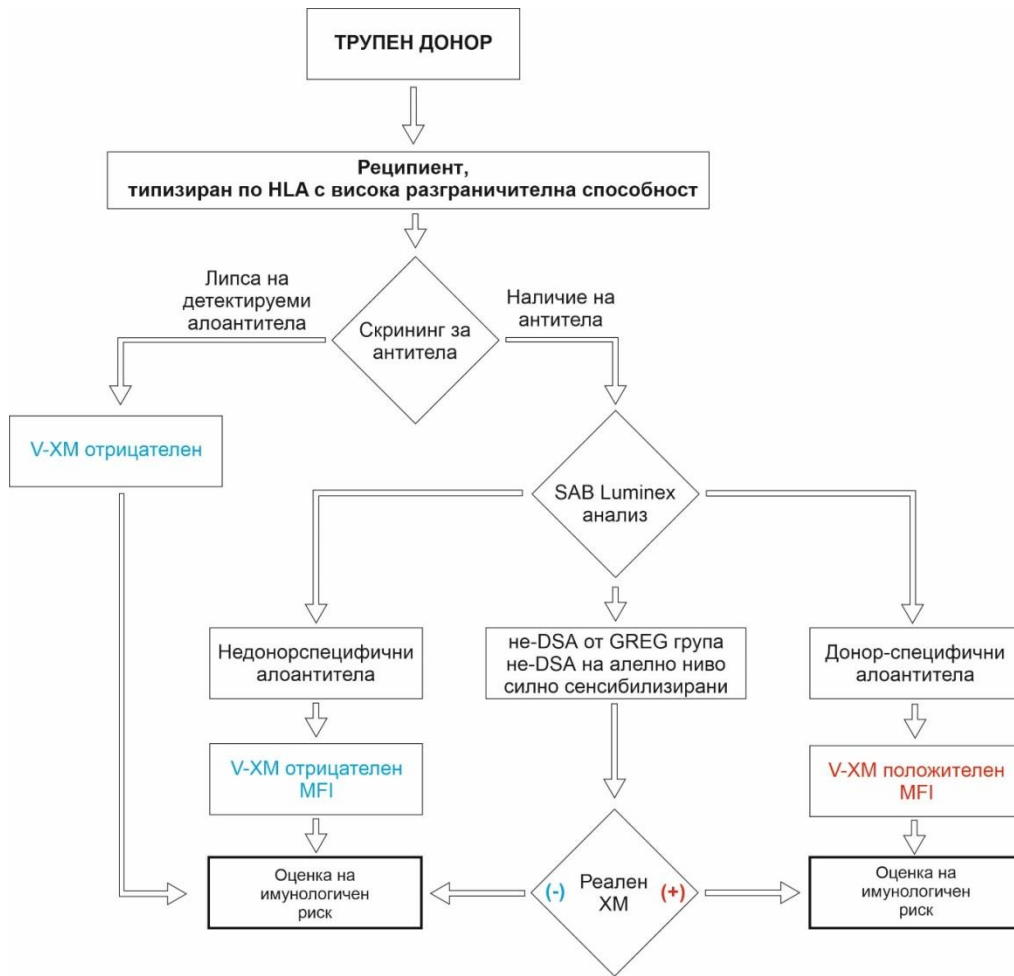
В проучване, проведено от Peräsaari et al. [Peräsaari JP, Jaatinen T и съавт., 2018], са сравнени V-ХМ с различни методи за провеждане на реален кросмач. От 83 кросмача най-добра корелация се наблюдава при FCХМ (83%). С LumХм и CDCХМ нивата на откриване на DSA са съответно 71% и 66%. С FCХМ най-добрата корелация е постигната с гранични стойности на MFI 1000 и 5000, за CDCХМ най-добрата точност е постигната с гранична стойност на MFI 5000, докато за LumХМ най-оптималната е от 10 000 MFI.

Едно от ограниченията на виртуалния кросмач са HLA антителата от клас II, тъй като техните таргети се формират от алфа- и бета-вериги, кодирани от различни гени. Друго ограничение на виртуалния кросмач е биологичното естество на кросмача и непредсказуемостта на донорния материал. Има широка вариация в експресията на HLA между донорите. Освен това се наблюдават значителни вариации между различните клетъчни източници (кръв, далак, лимфен възел). Промяната в нивата на експресия на HLA има пряко въздействие върху реактивността на FCХМ. Техниката за скрининг на антитела може да бъде стандартизирана, но плътността на HLA върху прицелните клетки не може. Следователно винаги ще има несигурност, освен ако нивата на експресия на HLA не бъдат оценени по време на провеждане на теста. Единствено методите, при които донорните антигени се улавят върху сфера, позволяват стандартизиране на количеството HLA на донора [Peräsaari JP, Jaatinen T и съавт., 2018].

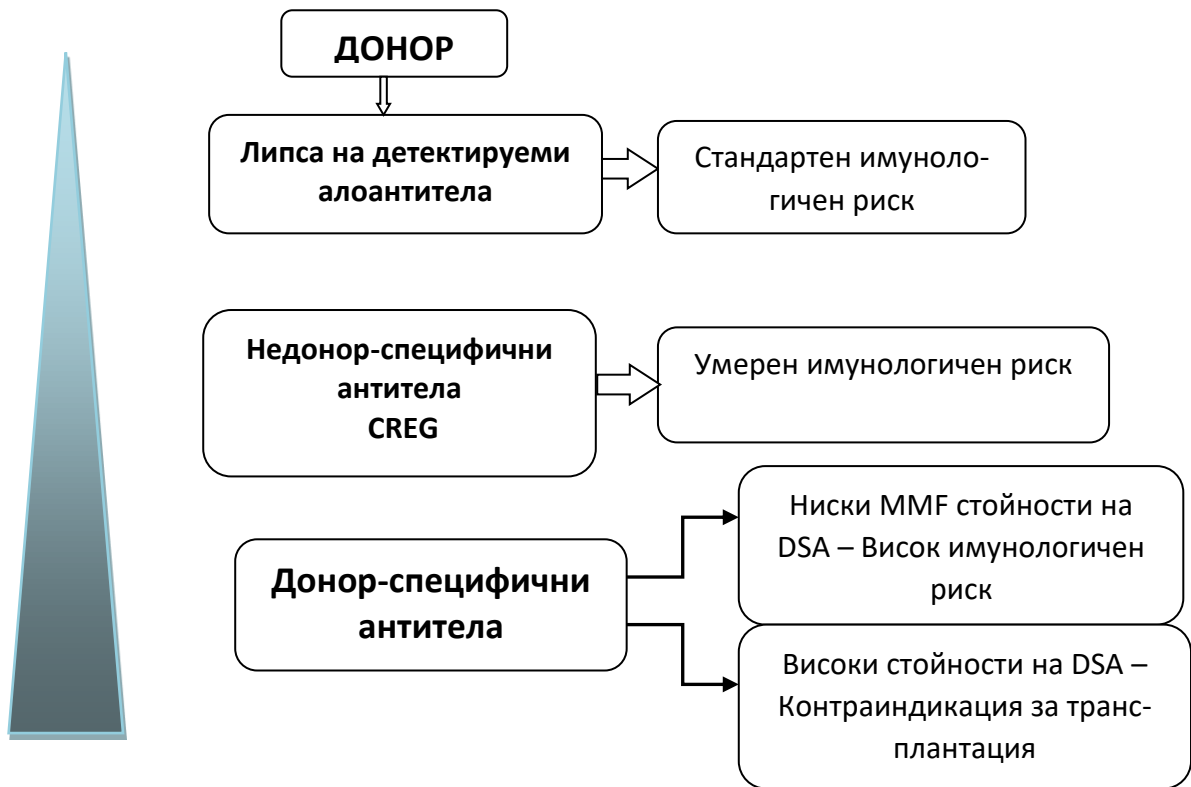
Виртуалният кросмач е приложим по време на търсене на съвместими за конкретен донор реципиенти чрез определяне на несъвместими или съвместими антигени. В литературата нараства броят на статии за успехите на няколко трансплантационни центъра за провеждане на трансплантации въз основа само на резултатите от V-ХМ преди трансплантация [Rohan VS, Pilch N и съавт., 2020]. На базата на тези данни част от центровете предлагат рутинно приложение на V-ХМ, поне в краткосрочен план за донорите от кавказки произход – при условие че е извършено HLA типизиране с висока разграничителна способност на трупните донори, а реален кросмач да се провежда само при силно сенсibiliзирани реципиенти. Вероятно V-ХМ ще се използва все по-често в бъдеще, особено за мъже, чакащи за първа БТ, без IgG анти-HLA антитела и при липса на данни за скорошни сенсibiliзиращи събития.

Виртуалният кросмач е разширение на традиционния, разчитайки на внимателно интерпретиран тест за HLA антитела, заедно с точна оценка на донорните HLA антигени. Кросмачът в реално време все още ще бъде необходим и използван.

В резултат на настоящото проучване разработихме алгоритъм (фигура 18) за определяне на алоимунната реактивност на реципиентите, чакащи бъбречна трансплантация, с цел предсказване с най-голяма вероятност на резултатите от кросмач теста (V-ХМ), който да намери приложение за оценка на имунологичния риск въз основа на алоантителния статус при реципиенти за бъбречна трансплантация (фигура 19).



Фигура 12. Алгоритъм за определяне на алоимунната реактивност на реципиентите, чакащи бъбречна трансплантация



Фигура 13. Оценка на имунологичния риск въз основа на алоантителния статус при реципенти

VI. ОБОБЩЕНИЕ

Откриването на DSA преди/след трансплантация е критично условие за прогнозиране на краткосрочна и дългосрочна преживяемост на присадката, а така също и критерий за диагностициране на антияло-медирано отхвърляне след трансплантация. Използването на чувствителните и специфични SAB методи позволява откриването на антитела, насочени специфично към HLA антигени на донора. Регулярното мониториране на алоантителния статус на реципиента, докато е в листата на чакащите, позволява те да бъдат актуализирани поне три пъти годишно, което от своя страна е предпоставка за извършването на V-XM и избор на подходящ трупен донор, а при живи донори да се избере подходящият, с който да се извърши реален XM и впоследствие трансплантация.

Определянето на донор-специфични антитела се базира на HLA типа на донора и резултатите от микросферовите (Luminex) анализи. Но SAB анализите не могат напълно да изключат наличието на HLA DSA, поради това че не всички HLA алели/епитопи са представени в тези тестове. В допълнение, нашите анализи показват, че най-честите антитела не винаги са с най-силна реактивност (най-голям "score" или MFI). Най-ниските "score" стойности за анти-HLA-Cw антителата може да се свържат с по-слабата имуногенност на тези антигени. Трябва да се вземат в съображение и споделените епитопи/епитопи като причина за тези разлики, което може да бъде обект на последващи анализи. Поради това вероятността за наличието на HLA антитела, които могат да не бъдат открити, трябва да се има предвид. При силно сенсibiliзираните пациенти е необходимо типизиране с висока разделителна способност на реципиент и донор за точно дефиниране на алелните специфичности на някои антитела. Мониторинг на алоимунния статус чрез използване на съвременните SAB технологии, в комбинация с разширено HLA типизиране, значително подобри способността ни да предсказваме имунологичния риск, свързан с бъбречна трансплантация за индивидуална двойка донор-реципиент.

В настоящото проучване направихме опит да оценим вероятностите за HLA несъвместими донори за алосенсibiliзираните пациенти, като съпоставихме разпределението на HLA специфичностите в контролна група от здрави индивиди и група от трупни донори с тези на алоантителата към съответните HLA антигени. Прави впечатление, че изчислените вероятности за несъвместим донор за пациентите при някои антителни специфичности са различни за контролната и донорската група, поради различната честота на HLA антигените в двете кохорти. Резултатите от този анализ могат да намерят приложение в рутинната ни практика и да послужат като първа стъпка за въвеждане на т.нар. калкулирани ПРА (cPRA) и за нашите пациенти. Оценката на процента на донорите, чиито органи биха били несъвместими за съответния потенциален реципиент, е особено важна при силно сенсibiliзираните реципиенти и ще повиши възможностите им за трансплантация.

Чрез скрининг и идентификация на HLA антитела преди трансплантация можем да предвидим до голяма степен резултата от кросмача (VXM), в подкрепа на което са и нашите данни. Независимо от това, в рутинната ни практика наблюдавахме

неочаквани и необясними резултати от FCXM. Някои от тях се дължаха на DSA, неоткрити в периодичните скрининги, вероятно поради de novo синтез или реактивация на паметови В-клетки, но част от причините не можаха да бъдат изяснени. Освен това използването на донорни клетки като мишена, при които има интраиндивидуална вариация в експресията на HLA и значителна вариация в нивата на експресия на HLA между различни индивиди, също може да оказва влияние върху чувствителността на кросмача в зависимост от донорските фактори. Следователно винаги ще има известна несигурност в предсказването на кросмача, поради което много добре трябва да се дефинират случаите, при които се взема в съображение само виртуалният кросмач, и тези, при които трябва да се извърши реален кросмач. Друга опция е използването на твърдофазови DSA тестове (LumXM), което ни мотивира да въведем и оценим възможностите за рутинно приложение на този вид кросмач. Независимо че установихме някои ограничения, считаме, че LumXM може да даде полезна допълнителна информация за оценка на съвместимостта при живи донори за бъбречна трансплантация, но трябва да се интерпретира внимателно заедно с алоантителния профил от SAB тестовете, класа на алоантителата, резултатите от FCXM и клиничния статус на реципиента, а не самостоятелно.

В допълнение, съпоставянето на данните от LumInex-SAB анализа с FCXM показва много високо съвпадение между реалния и виртуалния кросмач. Тъй като виртуалният XM сравнява неприемливите антигени за реципиента (антигени срещу които са открити антитела в неговите серумни проби) с HLA формулата на потенциалния донор чрез виртуално съпоставяне, точен актуализиран имунологичен профил на потенциалния реципиент е задължително необходим. Отрицателна V-XM при пациент без известна анамнеза за сенсibiliзация и регулярно изследван за алоантитела може да се счита за подходяща за трансплантация от трупен донор, без да е необходимо провеждането на реален кросмач. Въпреки това при пациенти с анамнеза за възможна сенсibiliзация FCXM е задължителен преди трансплантация. Резултатът от V-XM също зависи от времето на скрининга за DSA и може да варира в зависимост от това коя проба серум е използвана за тестване. Това е от значение за пациенти с анамнеза за сенсibiliзиращи събития, тъй като профилът на DSA може да се промени с времето, както стана ясно от проведеното проучване. Потенциално положителен V-XM може да възникне поради наличието на антитела срещу HLA-C, DQ α и DP антигени. Въпреки че точното имунологично значение на тези антигени и съответните им антитела все още е неясно, невключването им в скрининга, както и при HLA типизиране на донори и реципиенти, може да доведе до изненадващо положителен реален кросмач. Следователно за V-XM трябва да се вземат предвид всички предишни резултати, когато има такива, както и историята на сенсibiliзация на пациента. Тестовете, направени непосредствено преди трансплантацията, са най-надеждни и представляват най-новото състояние на DSA.

Днес се опитваме да прогнозираме имунологичния риск и резултата от трансплантацията с различен брой анализи, измерващи и оценяващи HLA имунизацията. Идентифицирането на подтипа на антиялото, свързването на комплемента, афинитета и титъра в индивидуална проба е възможно, но засега не винаги е рентабилно. Напредъкът в тази област е белязан от появата на следващо поколение SAB анализи и

нарастващ акцент върху епитоп-базирания анализ. Прилагането на V-ХМ, съчетано с разумното извършване на реален кросмач, се очертава като новия, по-успешен път за преодоляване на клинично значими реакции на отхвърляне при трансплантация.

VII. ИЗВОДИ

1. В служебния регистър на чакащите БТ в ИАМН средната възраст е 49 г., преобладават мъжете, а хипертонията, диабетът и сърдечно-съдовите заболявания са най-честите съпътстващи заболявания.

2. В служебния регистър на ИАМН има средно 32% сенсibiliзирани потенциални реципиенти за бъбречна трансплантация. Най-голям е дялът на пациентите с антитела срещу HLA клас I антигените, следвани от тези към клас II, а най-малко са пациентите с антитела срещу двата класа.

3. Основните фактори, повлияващи продукцията на HLA антитела, са предшестващи трансплантации, бременност и кръвопреливане, но неklasически сенсibiliзиращи събития също могат да се отразят на алоимунния статус.

4. Установената динамика в алоантителния статус на пациентите, чакащи БТ, във времето най-вероятно е резултат от различната диагностична стойност на използваните техники за определяне на HLA антитела.

5. Честотата на дефинираните най-чести алоантителни специфичности към HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPB1 и DPA1 не винаги е свързана с количеството (MFI) на антителата.

6. Съпоставянето на честотите на различните HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1 антигени в групата на здравите индивиди и трупните донори с наличието на антитела към тях при пациентите с положителен алоантителен статус позволи да се оцени шансът сенсibiliзиран пациент да може да бъде трансплантиран със съвместим донор. Шансът за някои антителни специфичности е различен за контролната и донорската група, което се дължи на различната честота на HLA специфичностите между двете групи.

7. Въведеният в проучването твърдофазов микросферов метод за откриване на донор-специфични антитела (LumXm) показва, че резултатите от него са съпоставими с тези от алоантителата и флоуцитометричния кросмач при по-високи титри на антителата, но според нас не може да се използва самостоятелно като тест за оценка на риска.

8. Резултатите от кросмач реакцията могат да бъдат предсказани на базата на рутинния претрансплантационен алоантителен скрининг и определяне на неприемливите HLA несъвместимости в 97,42% при пациентите с отрицателен алоантителен статус и в 96,49% при тези с анти-HLA антитела. Независимо от това, в рутинната практика могат да се наблюдават неочаквани и необясними резултати от FCXM, причините за които трябва да бъдат изяснени и внимателно интерпретирани при всеки пациент.

9. Виртуалният кросмач е приложим по време на търсене на съвместими за конкретен донор реципиенти, чрез определяне на несъвместимите или съвместими антигени, при условие че е извършено HLA типизиране с висока разграничителна способност на реципиентите в служебния регистър и на трупните донори, а реален кросмач да се провежда само при сенсibiliзирани реципиенти.

VIII. ПРИНОСИ

1. Характеризиран е демографският и клиничният профил на чакащите за БТ у нас. Данните може да се използват при разработване на здравни политики, касаещи най-уязвимите и рискови пациенти в регистъра.

2. Направена е комплексна характеристика на алосенсibiliзационния профил на пациентите в регистъра на чакащите БТ в България, като за първи път са анализирани антителата срещу HLA-DQA1,-DPA1 и -DPB1. Допълнени и обогатени са данните от предходни анализи.

3. За първи път у нас е проследена динамиката на алоантителата на пациентите от регистъра за БТ в хода на рутинните скрининги.

4. За първи път у нас е оценена вероятността алосенсibiliзирани потенциални реципиенти за БТ да бъдат трансплантирани със съвместим донор. Това е първа стъпка в разработването на програма за определяне на калкулирани ПРА и за пациентите от нашия регистър, с което ще се даде по-голям шанс за БТ на силно сенсibiliзираните пациенти.

5. За първи път у нас е въведен микросферов метод за кросмач реакция (Luminex XM) и са оценени възможностите за приложението му в рутинната практика при оценка на имунологичния риск за реципиента.

6. За първи път е направен анализ на съответствието между резултатите от реален FCXM и алоимунен профил на потенциалните реципиенти. Получените данни са залегнали в разработването на алгоритъм за извършване на V-XM и/или реален XM за претрансплантационна оценка на индивидуалния риска.

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ

Публикации във връзка с дисертационния труд:

1. **Янкова, П.**, А.Михайлова, М.Иванова, Цв.Луканов, Т. Кундуржиев, Е.Паскалев, Б.Златков, Ж.Филипов, Т.Методиева, Е.Наумова. Положителен флоуцитометричен кросмач при реципиенти за бъбречна трансплантация без предварителни данни за донорспецифични антитела. Нефрол.диал. транспл., 2018, 24(2), 46-52. Scopus
2. Михайлова, А., **П.Янкова**, Цв.Луканов, В.Атанасова, Н.Гешева, С.Лесичкова, Д.Маринова, Е.Наумова. Мястото на клетъчния имунологичен мониторинг в персонализиране на имunosупресивната терапия при пациенти с трансплантиран бъбрек – нашия опит” в Годишник на БАКИ, т.12, 2019,41-54. (индексирано, НАЦИД)
3. **Yankova, P**, A.Mihaylova, E. Naumova. Luminex crossmatch in kidney transplantation – single center experience. C. R. Acad. Bulg. Sci., 2023 (Accepted for publication), IF=0,3
4. **Yankova, P**, E.Paskalev, N.Chilingirova, A.Mihaylova, E. Naumova. Long-term survival in a heart and kidney transplant recipient: a case report. Bulg J Clin Immunol, 2024 (прието за публикуване)

Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд:

1. Mihaylova, A., **P.Yankova**, A.Antonova, M.Dimitrova, E.Naumova. Positive T-cell and negative B-cell flow cytometry crossmatch due to HLA-B donor-specific antibodies. ASHI 43-rd annual Meeting, September 11-15, 2017, San Francisco, CA, USA, Human Immunology 7, 78, Suppl.1, p.227, P235 (poster)
2. **Yankova, P.** Ts.Lukanov, A. Mihaylova, M.Ivanova, V. Atanasova, S. Lesichkova, M. Genova, D. Svinarov, E.Naumova. Personalized approaches for evaluation of immune response to therapy in kidney transplant patients. 33rd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, May 8-11, 2019 Lisbon, Portugal, (Oral presentation, O15), Abstract Book, HLA. 2019;93:263. DOI: 10.1111/tan.13518
3. Naumova, E., **P. Yankova**. Luminex crossmatch as a routine test in kidney transplantation. Annual EFI Region 8 Balkan EPT Meeting, November 25-26, 2022 Skopje, Republic of North Macedonia (Oral presentation)
4. **Yankova, P.**, A.Antonova, M. Dimitrova, A. Mihaylova, E. Naumova. Characterization of alloimmune status in kidney transplant recipients – immunological risk assessment. National Conference on Immunology – Sofia, December 16, 2022. Abstracts= \Bulgarian journal of clinical immunology, 2022, vol.15, №2, pp.32-33

Участие в научни проекти по темата на дисертационния труд:

„Предиктивен модел за оценка на пре-трансплантационен крос-мач и антитяло медирана реактивност при бъбречна трансплантация”, ДОГОВОР № Д-113/02.05.2017 г., МУ-София