

Aus der Chirurgischen Klinik – Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Stellenwert Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper für das
Patientenüberleben und den klinischen Verlauf nach orthotoper
Lebertransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sinem Ünlü

aus Hamburg

Datum der Promotion: 04. März 2022

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
ZUSAMMENFASSUNG	1
1. ABSTRACT - ENGLISH	1
2. ABSTRACT - DEUTSCH	2
3. EINFÜHRUNG	3
3.1. DIE LEBERTRANSPLANTATION – ENTWICKLUNG UND ZAHLEN	3
3.2. ALLOKATIONSVERFAHREN UND MODEL OF END-STAGE LIVER DISEASE SCORE	3
3.3. DAS HUMANE LEUKOZYTEN ANTIGEN-SYSTEM UND DONOR-SPEZIFISCHE ANTI-HLA ANTIKÖRPER	4
3.4. FORSCHUNGSSTAND: DSA IN DER LEBERTRANSPLANTATION	5
4. METHODIK	6
4.1. LUMINEX [®] -VERFAHREN	6
4.2. STUDIENDESIGN UND STUDIENPOPULATION	7
4.3. DATENERFASSUNG UND DEFINITIONEN	7
4.4. POSTOPERATIVE IMMUNSUPPRESSION	8
4.5. ABSTOßUNGEN UND ABSTOßUNGSTHERAPIEN	8
4.6. STATISTISCHE ANALYSE	9
4.7. FRAGESTELLUNG UND ENDPUNKTE	9
5. WESENTLICHE ERGEBNISSE	10
5.1. STUDIENPOPULATION	10
5.2. PATIENTEN- UND TRANSPLANTATÜBERLEBEN DER DSA+ UND GEMATCHTEN DSA- GRUPPE	11
5.3. SUBGRUPPENANALYSE DER DSA+ KOHORTE	12
5.4. ABSTOßUNGEN UND ABSTOßUNGSTHERAPIEN – VERGLEICH DER GEMATCHTEN KOHORTEN	12
6. DISKUSSION	13
7. LITERATURVERZEICHNIS	20
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	25
ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION	26
AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST	28
DRUCKEXEMPLAR DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATION	30
LEBENS LAUF	47
KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE	48
DANKSAGUNG	49

Abkürzungsverzeichnis

ABMR	Antikörper-vermittelte Abstoßung (<i>engl. Antibody-mediated rejection</i>)
AIH	Autoimmunhepatitis
AILD	Autoimmune Lebererkrankung (<i>engl. Autoimmune liver disease</i>)
ATG	Antithymozytenglobulin
BAR-Score	Balance of Risk-Score
CIT	Kalte Ischämiezeit (<i>engl. Cold ischemia time</i>)
DSA	Donor-spezifische anti-HLA Antikörper
DSA+	DSA-positiv
DSA-	DSA-negativ
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
LT	Lebertransplantation
MELD	Model of End-Stage Liver Disease
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PP	Plasmapherese
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
TCMR	T-Zell-vermittelte Abstoßung (<i>engl. T-cell-mediated rejection</i>)
WIT	Warme Ischämiezeit (<i>engl. Warm ischemia time</i>)

Hinweis: In dieser Arbeit wird aus Gründen des Leseflusses das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und andere Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist. Die Ausdrücke „Frauen/Männer“ bzw. „weiblich/männlich“ beziehen sich ausschließlich auf das biologische Geschlecht.

Zusammenfassung

1. Abstract - English

Background

The role of donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) in liver transplantation (LT) is not clearly established and is recently gaining more interest. To date, there is only little investigation regarding the clinical course of DSA-positive (DSA+) LT recipients and treatment options. In the present thesis, the impact of DSA on the outcome of LT recipients is evaluated throughout a retrospective study.

Methods

All LTs performed between January 1, 2008 and December 31, 2015 at the Charité-Universitätsmedizin Berlin were surveyed for this study. Living donor-, multivisceral-, high-urgency transplantations, retransplantations and recipients aged under 18 years were excluded from the analysis. Only DSA detected by the Luminex[®] assay were taken into consideration. DSA levels were quantified by the normalized mean fluorescence intensity. A propensity score matching based on the components of the Balance of Risk (BAR) score was performed to receive a DSA-negative (DSA-) control group. The clinical courses and mortality of DSA+ recipients were compared to all DSA- recipients and the matched control group.

Results

A total of 113 DSA+ LT recipients (22.2%) were identified and matched 1:1 with 113 DSA- patients. Median BAR-Score at LT was 8 (3-13) in DSA+ and 7 (4-13) in DSA- patients ($p=0.619$). The DSA+ group consisted of significantly more women than the DSA- group ($n=55, 48.7\%$ vs. $n=33, 29.2\%$; $p=0.003$). One-year patient survival after LT was inferior in DSA+ compared to DSA- recipients with 74.3% vs. 84.8% ($p=0.053$). The difference was not significant either at three (71.2% vs. 71.5% , $p=0.821$) and five years (69.3% vs. 64.9% , $p=0.818$). Sepsis as the leading cause of death within the first postoperative year was significantly more frequent in the DSA+ group (9.7% vs. 1.8% ; $p=0.046$). DSA+ patients were more often treated for rejection [$n=77 (68.1\%)$ vs. $37 (32.7\%)$ in the control group, $p<0.001$].

Conclusion

DSA seem to have an indirect, negative impact on patient survival within the first year after LT. Their presence may influence the decision-making post LT in terms of immunosuppressive treatment, leading to infectious complications and higher mortality. Further investigation and standardized guidelines are required in regard to DSA in LT.

2. Abstract - Deutsch

Hintergrund

Der Stellenwert Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper (DSA) in der Lebertransplantation (LT) ist derzeit noch unklar und erfährt erst seit jüngerer Zeit wachsendes Interesse. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen bezüglich des klinischen Verlaufs von DSA-positiven (DSA+) LT-Empfängern und einer möglicherweise notwendigen weiterführenden Therapie. In dieser Arbeit wird mithilfe einer retrospektiven Studie der Einfluss von DSA auf den klinischen Verlauf und das Überleben von LT-Empfängern evaluiert.

Methoden

Alle zwischen dem 1. Januar 2008 und dem 31. Dezember 2015 in der Charité-Universitätsmedizin Berlin erfolgten LTs wurden für die Studie herangezogen. Lebendspenden, Multiviszeral-, high urgency-Transplantationen, Re-Transplantationen und Empfänger jünger als 18 Jahre wurden aus der Studie ausgeschlossen. Es wurden nur DSA berücksichtigt, die durch das Luminex[®]-Verfahren detektiert wurden. DSA-Level wurden anhand der mittleren Fluoreszenzintensität quantifiziert. Anhand der Komponenten des Balance of Risk (BAR) Scores wurde ein Propensity Score Matching durchgeführt, um eine DSA-negative (DSA-) Kontrollgruppe zu bilden. Die DSA+ Empfänger wurden hinsichtlich ihres klinischen Verlaufs und der Mortalität mit allen DSA- Patienten und der gematchten Kontrollgruppe verglichen.

Ergebnisse

Insgesamt konnten 113 DSA+ LT-Empfänger (22.2%) identifiziert und 1:1 mit 113 DSA- Patienten gematcht werden. Der mediane BAR-Score bei LT lag bei 8 (3-13) in der DSA+ und 7 (4-13) in der DSA- Gruppe ($p=0.619$). Der Anteil an Frauen war in der DSA+ Gruppe signifikant höher als in der gematchten DSA- Gruppe ($n=55, 48.7\%$ vs. $n=33, 29.2\%$; $p=0.003$). In der DSA+ Gruppe zeigte sich mit 74.3% vs. 84.8% ($p=0.053$) ein kürzeres ein-Jahres-Patientenüberleben nach LT als bei DSA- Empfängern. Nach drei [71.2% vs. 71.5% ($p=0.821$)] und fünf Jahren [69.3% vs. 64.9% ($p=0.818$)] bestand weiterhin kein signifikanter Unterschied. Sepsis und Infektionen stellten innerhalb des ersten postoperativen Jahres bei DSA+ Patienten signifikant häufiger die Haupttodesursache dar (9.7% DSA+ vs. 1.8% DSA-; $p=0.046$). DSA+ Patienten erhielten häufiger eine Abstoßungstherapie als DSA- [$n=77 (68.1\%)$ vs. $37 (32.7\%)$, $p<0.001$].

Zusammenfassung

DSA scheinen einen indirekten, negativen Einfluss auf das Patientenüberleben innerhalb des ersten Jahres nach LT zu haben. Ihr Vorhandensein beeinflusst womöglich die Entscheidungsfindung nach LT bezüglich der immunsuppressiven Therapie, was im Verlauf zu infektbedingten Komplikationen und einer erhöhten Mortalität führt. Eine weitere Erforschung sowie die Definition von Leitlinien bezüglich DSA in der LT sind erforderlich.

3. Einführung

3.1. Die Lebertransplantation – Entwicklung und Zahlen

Bei der Lebertransplantation (LT) wird die Leber operativ aus dem Körper eines Spenders entnommen und in den Körper eines anderen Menschen, den sogenannten Empfänger, eingepflanzt. Seit der ersten erfolgreichen Lebertransplantation in Denver im Jahr 1967 hat sie sich zu einem verbreiteten und erprobten Verfahren bei terminaler Lebererkrankung entwickelt. Als Meilensteine für diese Entwicklung sind insbesondere das verbesserte immunologisch-pathophysiologische Verständnis der Transplantation, die Weiterentwicklung und Einführung von Immunsuppressiva und der operativ-technische Fortschritt anzusehen. Zu letzterem zählen auch die verbesserte Organkonservierung, die Vernetzung bei der Organ-Allokation, sowie die allgemeine perioperative Versorgung.

In Deutschland erfolgte die erste Lebertransplantation 1969 durch A. Gütgemann und T.S. Lie in Bonn. Heute kann man hierzulande auf viele Jahrzehnte Erfahrung und über 24.000 durchgeführte Lebertransplantationen zurückgreifen ¹.

Der größte Therapie-limitierende Faktor ist heutzutage die allgemeine Organknappheit. Im Jahr 2019 waren in Deutschland 1.385 Personen für eine Lebertransplantation (inklusive Multiviszeraltransplantationen) auf der Warteliste gemeldet. Im selben Jahr wurden hier jedoch nur insgesamt 831 Lebertransplantationen an 21 Transplantationszentren durchgeführt. Insgesamt verstarben in Deutschland in diesem Zeitraum 250 Patienten (18%) auf der Warteliste ^{2, 3}. Mit 10,8 Organspendern pro einer Million Einwohner bildet Deutschland im europäischen Vergleich das Schlusslicht bei der Bereitschaft zur Organspende. In ganz Europa wurden 2019 jährlich zuletzt insgesamt 4719 Lebertransplantationen durchgeführt ¹, in den USA waren es 2019 insgesamt 8.896 ⁴.

Weltweit war bisher die HCV-assoziierte Zirrhose die Haupt-Indikation der Lebertransplantation bei Erwachsenen ⁵. In Europa stellten in den letzten Jahren die Alkohol-assoziierte Zirrhose, das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) sowie die Hepatitis C-Virus-assoziierte Zirrhose die häufigsten Indikationen dar, jedoch gewinnt insbesondere die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung ⁶⁻⁹.

3.2. Allokationsverfahren und Model of End-Stage Liver Disease Score

Die Transplantation ist in Deutschland durch mehrere Instanzen geregelt. Auf rechtlicher Ebene wird sie durch das Transplantationsgesetz von 1997 begründet ¹⁰, die klinischen Richtlinien sind durch die Bundesärztekammer (letzte Fassung von 2018) vorgegeben ¹¹.

Die Vermittlung von Spenderorganen erfolgt seit 1970 in Deutschland über die Stiftung *Eurotransplant*. Diese ist ein Zusammenschluss von acht europäischen Ländern zur Verteilung der Spenderorgane innerhalb der Mitgliedsstaaten. Auf nationaler Ebene erfolgt die enge Zusammenarbeit von *Eurotransplant* mit den jeweiligen Organspende-Organisationen, in Deutschland wird diese seit 2000 durch die *Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO)* repräsentiert. Die Aufgabe der *DSO* ist die bundesweite Koordinierung aller Organtransplantationen. In den USA werden die Aufgaben von *Eurotransplant* und der *DSO* vom *United Network for Organ Sharing (UNOS)* übernommen, welche ebenfalls Richtlinien bezüglich Organtransplantationen bereitstellt.

Die Leber-Allokation erfolgt im Fall der post-mortem Lebertransplantation bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung seit 2006 anhand des Model of End-Stage Liver Disease (MELD)-Scores. Dieser errechnet sich für den jeweiligen Patienten mithilfe des Serum-Kreatinins, des Gesamt-Bilirubins sowie des INR (International Normalized Ratio)-Werts. Der errechnete MELD-Wert (labMELD) wird auf ganze Zahlen gerundet, der maximal erreichbare Punktwert liegt bei 40. Die Höhe des Wertes korreliert mit der Schwere des Leberschadens, eine Rezertifizierung muss innerhalb vorgegebener zeitlicher Fristen erfolgen. Bildet der MELD-Score die Erkrankungsschwere nicht angemessen ab, kann bei bestimmten Entitäten eine außerordentliche Listung im Sinne einer „standard exception“ unter Zuweisung eines match-MELD-Scores beantragt werden¹¹. Transplantationsbedürftige Patienten mit akutem Leberversagen unterliegen den von *Eurotransplant* verwendeten Dringlichkeits-Kriterien (King's College Kriterien) und werden unter dem Status „high urgency“ (HU, engl. „hohe Dringlichkeit“) gemeldet und priorisiert^{11, 12}.

3.3. Das Humane Leukozyten Antigen-System und Donor-spezifische anti-HLA Antikörper

Das Major Histocompatibility-Complex (MHC)-, beim Menschen das Humane Leukozyten Antigen (HLA)-System genannt, ist ein wesentlicher Bestandteil der Vermittlung der menschlichen Immunantwort. HLA-Moleküle befinden sich an der Zelloberfläche kernhaltiger Zellen und dienen dort der Präsentation prozessierter Antigene zur Erkennung durch T-Lymphozyten^{13, 14}. Letztere identifizieren die Antigene infolge als alloge (körperfremd) oder autolog (körpereigen)^{15, 16}.

Die Gene HLA-A, HLA-B und HLA-C bilden die HLA-Klasse I; Klasse II beinhaltet HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ. HLA der Klasse I werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert, Klasse II-Moleküle hingegen nur auf Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, B-

Zellen und Monozyten¹⁷. Die Anzahl an HLA-Molekülen an der Zelloberfläche unterscheidet sich zwischen den Zelltypen: Immunzellen tragen viele HLA-Moleküle, während Hepatozyten vergleichsweise gering besetzt sind¹⁸. Einige Zytokine können jedoch zur erhöhten Expression von HLA Klasse II-Molekülen führen, unter anderem auf Hepatozyten im Rahmen einer Transplantation^{19, 20}.

Jeder Mensch verfügt über ein individuelles, festgelegtes HLA-Profil. Beim Einbringen fremder HLA-Moleküle, z.B. im Rahmen einer Organtransplantation, können infolge der T-Zell- und konsekutiven B-Zell-Aktivierung im Körper des Empfängers Antikörper gegen die HLA-Moleküle des Spenders (engl. donor) gebildet werden, sogenannte Donor-spezifische Antikörper (DSA)^{21, 22}. Existieren diese Antikörper bereits vor der Transplantation, nennt man sie präformierte DSA. Entstehen sie erst nach der Transplantation, so sind es *de novo* DSA.

3.4. Forschungsstand: DSA in der Lebertransplantation

Vor ca. 30 Jahren wurden erste humorale Abstoßungen nach LT beschrieben^{23, 24}. Dennoch ging man lange Zeit von einer Resistenz der Transplantatleber gegenüber DSA und dem Auftreten Antikörper-vermittelter Abstoßung (engl. *antibody-mediated rejection*, ABMR) aus. Als Voraussetzungen dafür wurden unter anderem die duale Blutversorgung der Leber (arteriell und portalvenös) und die Größe des Organs angenommen²⁵. Das Lebertransplantat sezerniert zudem lösliche HLA-Klasse I-Moleküle in den Blutkreislauf des Empfängers²⁶. Deren mögliche Immunkomplexbildung mit dort vorhandenen Klasse I-DSA²⁵ wird als wichtiger Mechanismus dieser Resistenz vermutet. Eine maßgebliche Rolle in diesem Prozess scheinen Kupffer-Zellen zu haben: Durch Absorption solcher Immunkomplexe sowie aktivierter Thrombozyten und aktiviertem Komplement begrenzen sie deren schädigenden Einfluss^{25, 27}.

Mit der Zeit häuften sich jedoch Studien über Faktoren, die diese Toleranzmechanismen beeinträchtigen und in Folge zu einer ABMR führen können, wie zum Beispiel hohe Antikörpertiter, Phasen akuter T-Zell-vermittelter Abstoßung (engl. *T-cell-mediated rejection*, TCMR) oder Infektionen^{20, 28-31}. Welche Faktoren im Zusammenspiel zu einer ABMR nach LT führen, ist jedoch noch unklar.

Im Jahr 2016 wurden mit den Banff-Kriterien erstmals standardisierte, vor allem histopathologische ABMR-Kriterien aufgestellt. Diese beinhalten neben DSA-Positivität unter anderem Angaben zur Immunfixation mikrovaskulärer C4d (Komplement-)Ablagerungen, sowie histologische Zeichen mikrovaskulärer Inflammation³².

Der Einfluss von DSA auf den klinischen Verlauf nach LT konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden. Während einige Studien eine Assoziation zwischen DSA und akuten bzw.

chronischen Abstoßungen vermuten lassen³³⁻³⁸, weichen die Ergebnisse bezüglich des Einflusses auf das Patienten- und Organüberleben auseinander^{33, 35-43}.

In der Nierentransplantation nehmen DSA hingegen bereits seit vielen Jahren eine wichtige Rolle bezüglich des Patienten- und Transplantatüberlebens ein^{44, 45}. Auch bei anderen transplantierten Organen wie dem Herz⁴⁶, der Lunge⁴⁷ oder dem Pankreas⁴⁸ gibt es inzwischen Hinweise für einen negativen Einfluss von DSA auf das Organ- und Patientenüberleben.

4. Methodik

4.1. Luminex[®]-Verfahren

Die Testung auf DSA erfolgte in der Charité-Universitätsmedizin Berlin ab dem 01.01.2008 bei allen LT-Kandidaten sowie -Empfängern mittels des Luminex[®] 200-Verfahrens, welches zu den Festphasen-Immunoassays zählt. Die Luminex[®]-Assays nutzen sog. *microbeads* (zu dt.: Mikropartikel) aus Polysterol. Jede dieser beads ist mit zwei HLA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen imprägniert. Enthält das Testserum Antikörper gegen die spezifischen HLA-Moleküle, binden sie an die jeweilige bead. Diese Bindung kann dann durch einen sekundären, Fluoreszenz-markierten Antikörper gegen humanes Immunglobulin G (IgG) detektiert werden. Die Kombination der Fluoreszenzsignale der beads und der jeweiligen Antikörper kann durch Detektoren des Luminex[®]-Systems und die entsprechende Software ausgewertet werden⁴⁹. Im Rahmen dieses Verfahrens wird die mittlere Fluoreszenzintensität, kurz MFI, gemessen, die als Surrogatmarker der Antikörper-Menge gilt^{35, 49}. Bislang gibt es keinen internationalen Konsens über einen einheitlichen MFI-Schwellenwert, ab dem DSA als positiv bewertet werden⁵⁰. Im Institut für Gewebetypisierung der Charité-Universitätsmedizin Berlin liegt dieser Wert bei >1000 und wurde entsprechend in dieser Arbeit als Schwelle für DSA-Positivität verwendet.

Alle LT-Empfänger wurden vor der Listung zur und am Tag der LT auf das Vorhandensein von anti-HLA-Antikörpern getestet, um präformierte DSA detektieren zu können. Nach der LT erfolgten Screenings auf *de novo*-DSA bis zur Verlegung auf die Normalstation wöchentlich, oder aber zusätzlich auf Anfrage des behandelnden Chirurgen. Im weiteren Verlauf wurden die Tests bei Patienten mit beeinträchtigter Organfunktion oder zur Nachverfolgung zuvor detektierter DSA durchgeführt.

4.2. Studiendesign und Studienpopulation

Alle Patienten, die zwischen dem 01.01.2008 und dem 31.12.2015 an der Charité-Universitätsmedizin Berlin eine orthotope post-mortem LT erhielten, wurden retrospektiv analysiert. Endpunkt der Datenerfassung war der 01.01.2018.

Ausschlusskriterien waren ein Empfängeralter <18 Jahre zum Zeitpunkt der LT, Multiviszeral-, Re- und high-urgency-Transplantationen. Bei den verbleibenden Patienten erfolgte ein Abgleich der HLA-Typisierung des Spenders mit den detektierten anti-HLA-Antikörpern des Empfängers zur Erfassung von DSA. Es wurden ausschließlich Antikörper der Genorte HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 und -DQB1 berücksichtigt, die innerhalb des stationären Aufenthaltes der LT detektiert wurden. Die Studienpopulation wurde daraufhin in zwei Gruppen aufgeteilt, eine DSA-positive (DSA+) und eine DSA-negative (DSA-) Gruppe.

Um potenzielle Störfaktoren weitestgehend auszuschließen, wurde ein 1:1 Matching der DSA+ mit DSA- Empfängern anhand der Bestandteile des Balance of Risk (BAR-) Scores durchgeführt. Dieser beinhaltet den MELD-Score, das Alter des Spenders und des Empfängers, die Notwendigkeit lebenserhaltender Maßnahmen vor der LT, vorausgegangene LT und die kalte Ischämiezeit (engl. *cold ischemia time*, CIT). Er reicht von 0 bis 27 Punkten und korreliert positiv mit der Patienten-Mortalität ⁵¹.

Die DSA+ Patienten wurden hinsichtlich der demographischen Parameter, des klinischen Verlaufs und des Patienten- und Transplantatüberlebens mit beiden DSA- Gruppen verglichen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin genehmigt (ID: EA4/061/17).

4.3. Datenerfassung und Definitionen

Patientendaten wurden retrospektiv mithilfe des Klinik-internen Daten-Systems SAP® (Walldorf, Deutschland) erfasst und in pseudonymisierter Form in einer digitalen Datentabelle gespeichert. Wichtigste Parameter waren hierbei neben demographischen Daten serologische Leberfunktionsparameter, die Form der Basisimmunsuppression, Abstoßungen und Abstoßungstherapien sowie histopathologische Befunde der Leberbiopsien.

Befunde zu anti-HLA-Antikörpern sowie MFI-Werte wurden aus der *HLA Fusion* Software (OneLambda, Inc., West Hills, CA, USA) übertragen. Anonyme Spender-Daten wurden aus dem *Eurotransplant Network Information System* (ENIS) übernommen.

Die Definition der CIT, WIT (engl. *warm ischemia time*, warme Ischämie-Zeit) sowie des Patienten- und Transplantatüberlebens erfolgten anhand der *UNOS*-Kriterien ^{52, 53}. Die CIT ist

dabei die Zeit von der Perfusion des Spenders mit Konservierungslösung bis zur Reperfusion im Empfänger. Die WIT beschreibt die Anastomosenzzeit während der Transplantation bis zur Reperfusion der Leber.

Das Patientenüberleben ist definiert als die Zeit von der LT bis zum Tod des Patienten bzw. dem Endpunkt der Datenerfassung. Das Organüberleben ist die Zeit von der LT bis zum irreversiblen Transplantatversagen, dem Tod des Patienten, oder dem Endpunkt der Datenerfassung.

Der MELD- und der BAR-Score wurden nach den von *UNOS* und *Eurotransplant* bereitgestellten Formeln berechnet und geben eine Überlebensprognose nach LT^{51, 54}. Der BAR-Score berücksichtigt hierbei sowohl Empfänger- als auch Spender-Kriterien, der Donor-Risk-Index (DRI) nach Feng *et al.* berücksichtigt ausschließlich Charakteristika des Spenders⁵⁵.

4.4. Postoperative Immunsuppression

Die postoperative Immunsuppression (IS) erfolgte nach standardisierten klinikinternen Protokollen. Patienten mit präformierten DSA erhielten keine gesonderte Anpassung des Protokolls.

Die Standard-IS bestand für alle LT-Empfänger aus Prednisolon und Tacrolimus, wobei ersteres bei den meisten Patienten innerhalb von zwei Monaten nach LT komplett ausgeschlichen wurde. Patienten mit einer Autoimmunerkrankung der Leber (AILD) als LT-Indikation erhielten zudem eine Induktion mit Antithymozytenglobulin (ATG) oder IL-2-Rezeptorantagonisten. Sie erhielten zusätzlich Mycophenolat-Mofetil, welches in Kombination mit Tacrolimus die dauerhafte Basis-IS in diesem Patientenkollektiv bildete. Der initiale Tacrolimus-Spiegel wurde zwischen 6-8 ng/ml bei Standard-LT und 8-10 ng/ml für LT bei AILD festgelegt. Innerhalb von sechs Monaten wurde die Dosis auf einen Erhaltungsspiegel von 4-6 ng/ml reduziert.

Für ein Monitoring der IS erfolgten regelmäßige Spiegel-Messungen der Medikamente sowie die regelmäßige Kontrolle der Leberfunktionsparameter. Letztere erfolgte zu Beginn täglich und danach routinemäßig 3, 6, 12, 18, 24, 36 und 60 Monate nach Entlassung.

4.5. Abstoßungen und Abstoßungstherapien

Der Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion sowie eine Leberbiopsie erfolgten meist aufgrund einer Erhöhung der serologischen Leberfunktionsparameter nach Ausschluss anderer Ursachen. Routine-Leberbiopsien wurden nach einem, drei und fünf Jahren durchgeführt. Die histologische Diagnosesicherung sowie die Einteilung des Schweregrads der Transplantat-Abstoßung erfolgten anhand der Banff-Kriterien von 2000 und später anhand des Updates von 2016^{32, 56}.

Diese beinhalten vor allem die Beurteilung der Gallengänge und Gefäße zur Einteilung in akute bzw. chronische, sowie zelluläre bzw. humorale Abstoßung.

Auf einen klinischen Verdacht oder eine histologisch gesicherte Abstoßung hin wurde eine Abstoßungstherapie eingeleitet. Diese bestand aus einem mehrtägigen Steroidbolus und der Erhöhung der Standard-Immunsuppression. Bei therapierefraktärer TCMR wurde eine ATG-Therapie durchgeführt. Im Falle einer ABMR erfolgte eine Erweiterung mittels Plasmapherese (PP), intravenösen Immunglobulinen (IVIG) und selten Rituximab (monoklonaler anti-CD20-Antikörper). Bei therapierefraktären Abstoßungsreaktionen wurden vereinzelt Kontroll-Biopsien durchgeführt. Einige Patienten erhielten eine Abstoßungstherapie bei uneindeutigem Befund oder fehlender histologischer Sicherung einer Rejektion. Diese Fälle wurden anhand der erhaltenen Therapie retrospektiv definiert als „TCMR oder ABMR, behandelt im Rahmen eines klinischen Verdachts“.

4.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse und graphische Darstellung der erfassten Daten erfolgte mit den Programmen *IBM SPSS® Statistics*, Version 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) sowie *GraphPad Prism*, Version 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Kategoriale Daten wurden als Häufigkeiten und Prozente angegeben und mittels des Chi-Quadrat-Tests verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden als Median und Interquartilsabstand (IQR, *engl. interquartile range*) dargestellt und mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Das Matching der DSA+ Studienpopulation mit DSA- Fällen erfolgte mithilfe der Propensity-Score Methode mit logistischem Regressionsmodell. Mit Ausnahme des Re-Transplantations-Status (Ausschlusskriterium) wurden alle Kriterien des BAR-Scores für den Matching-Prozess herangezogen.

Das Patienten- und Transplantatüberleben wurde mittels Kaplan-Meier-Analyse und dem Log-Rank-Test dargestellt und verglichen.

Ein zweiseitiger p-Wert von unter 0.05 wurde in dieser Arbeit als statistisch signifikant gewertet.

4.7. Fragestellung und Endpunkte

Ziel der vorliegenden retrospektiven Studie war es, den Einfluss des Vorhandenseins von DSA auf den klinischen Verlauf nach orthotoper LT zu evaluieren. Primärer Endpunkt war der Vergleich

des Patienten- und Transplantatüberlebens anhand des DSA-Status. Sekundärer Endpunkt war das Auftreten von Abstoßungsreaktionen und Todesursachen.

5. Wesentliche Ergebnisse

5.1. Studienpopulation

Von den insgesamt 687 durchgeführten LTs im Untersuchungszeitraum wurden 510 in die Studie eingeschlossen. Für alle Patienten waren klinische Daten verfügbar. Bei 113 Patienten (22.2%) lagen DSA vor. Der Großteil der DSA+ Patienten hatte ausschließlich *de novo*-DSA (n=55, 48.6%), gefolgt von denjenigen mit ausschließlich präformierten DSA (n=49, 43.4%). Neun (8%) der Patienten präsentierten sowohl präformierte als auch *de novo*-DSA. Die übrigen Patienten (n=397, 77.8%) waren DSA-. Die DSA gehörten in 50.9% (n=28) der Patienten mit *de novo*-DSA und 10.2% der Patienten mit präformierten DSA (n=5, **p < 0.001**) zur HLA Klasse II. *De novo*-DSA wurden im Median nach 13 Tagen (10-20) das erste Mal detektiert.

Die Patienten wurden im Median über 58 (29-86) Monate nachverfolgt.

Sowohl in der DSA+ als auch der DSA- Gruppe war die alkoholische Zirrhose [n=34 (30.1%) vs. n=188 (47.4%); **p = 0.001**] die Hauptindikation für die LT, gefolgt vom hepatozellulären Karzinom (HCC) [n=32 (28.3%) vs. n=157 (39.5%), **p = 0.029**].

Der mediane BAR-Score zum Zeitpunkt der LT war signifikant höher in der DSA+ Gruppe [8 (3-13) vs. 6 (3-9), **p = 0.013**]. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich im medianen MELD-Score [DSA+ 16 (9-22) vs. DSA- 15 (10-20); p= 0.377] oder dem medianen Alter der Empfänger zum Zeitpunkt der LT [DSA+ 54 (48-61) vs. DSA- 57 (51-62) Jahre]. In der DSA- Gruppe zeigte sich in 28% (n=111) ein Geschlechter-Mismatch zwischen Spender und Empfänger im Sinne der Übertragung eines Organs einer weiblichen (female, F) auf eine männliche (male, M) Person (F-M Mismatch). In der DSA+ Gruppe betrug dieser Anteil 17.7% (n=20, **p = 0.028**).

Vergleich der nach BAR-Score gematchten Gruppen

Aus der DSA- Gruppe wurden 113 Patienten 1:1 mit den DSA+ Patienten gematcht. Das Follow-Up betrug in dieser Gruppe im Median 59 (25-101) Monate.

Auch diese Gruppen unterschieden sich signifikant in der Anzahl der Patienten mit alkoholischer Zirrhose [DSA+ n=34 (30.1%) vs. DSA- 56 (49.6%), **p = 0.003**], nicht jedoch im Vorhandensein eines HCC [n=32 (28.3%) vs. 45 (39.8%), p= 0.068]. Die alkoholische Zirrhose stellte in dieser Gruppe die Haupt-Indikation für die LT dar, jedoch hatten DSA+ Patienten im Vergleich häufiger eine zugrundeliegende PSC, PBC, AIH oder NASH bzw. kryptogene Zirrhose.

Es wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des BAR-Scores [DSA+ 8 (3-13) vs. DSA- 7 (4-13); $p=0.619$] oder seiner Bestandteile festgestellt [MELD bei LT: 16 (9-22) vs. 16 (10-29); $p=0.426$; Notwendigkeit lebenserhaltender Maßnahmen vor LT: $n=6$ (5.4%) vs. 4 (3.6%), $p=0.322$; Empfänger-Alder: 54 (48-61) vs. 57 (51-62) Jahre, $p=0.061$; Spender-Alder: 56 (44-69) vs. 59 (45-70) Jahre, $p=0.301$].

In beiden Gruppen zeigte sich eine vergleichbare Anzahl an Patienten mit hohem (>35) labMELD [DSA+ $n=20$ (17.7%) vs. DSA- $n=16$ (14.2%), $p=0.686$]. Es zeigte sich eine signifikant kürzere CIT und WIT in der DSA+ Gruppe [CIT: 9.7 (8-11) vs. 10.2 (9-12) Stunden, $p=0.021$; WIT: 43 (38-50) vs. 48 (40-56) Minuten; $p=0.012$].

Drei Leberfunktionsparameter zeigten zu einzelnen Zeitpunkten signifikante Unterschiede [Gamma-Glutamyl-Transferase am 7. postoperativen Tag (POD): DSA+ 245 (134-435) vs. DSA- 206 (118-308), $p=0.047$; Albumin am 7. POD: 2.9 (2.7-3.1) vs. 3.0 (2.8-3.3), $p=0.010$; Alkalische Phosphatase 12 Monate nach LT: 106 (81-202) vs. 97 (75-129), $p=0.043$], über den Gesamt-Zeitraum waren ihre Verläufe jedoch vergleichbar.

Die DSA+ LT-Empfänger hatten insgesamt einen signifikant längeren medianen Krankenhausaufenthalt [38 (28-62) vs. 32 (23-49) Tage; $p=0.012$] und wurden signifikant länger auf der Intensivstation behandelt [13 (7-32) vs. 9 (6-15) Tage; $p=0.008$].

Die DSA+ Gruppe umfasste signifikant mehr Frauen als die gematchte DSA- Gruppe ($n=55$, 48.7% vs. $n=33$, 29.2%; $p=0.003$). Dieser Anteil war noch höher unter den Patienten mit präformierten DSA (65.3% Frauen). Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit eines F-M Mismatches zwischen DSA+ und DSA- Patienten festgestellt [$n=20$ (17.7%) vs. $n=30$ (26.6%); $p=0.109$].

5.2. Patienten- und Transplantatüberleben der DSA+ und gematchten DSA-Gruppe

Das Patientenüberleben im ersten Jahr nach LT betrug in der DSA+ Gruppe 74.4% und der DSA-Gruppe 84.8% ($p=0.053$), nach drei Jahren 71.8% vs. 71.2% ($p=0.821$) und nach fünf Jahren 69.3% vs. 64.9% ($p=0.818$).

Die Haupttodesursache bei DSA+ Patienten im ersten postoperativen Jahr waren Infektionen bzw. Sepsis ($n=11$, 9.7%), und sie verstarben daran signifikant häufiger als DSA- Patienten ($n=2$, 1.8%; $p=0.046$). Die häufigste Sepsis-Ursache war die nosokomial erworbene Pneumonie ($n=7$ der DSA+, $n=2$ der DSA- Patienten). Alle Todesfälle durch Infektionen/Sepsis ereigneten sich innerhalb der ersten sechs Monate nach LT. Die Gruppen waren hinsichtlich anderer Todesursachen vergleichbar (kardiovaskulär 6.2% vs. 8.0%, $p=0.692$; hepatisch 3.5% vs. 2.7%, $p=0.788$; maligne Erkrankung 3.5% vs. 2.7%, $p=0.788$). Das Transplantatüberleben in der DSA+

Kohorte war im ersten Jahr nach LT niedriger als bei DSA- (73.4% vs. 79.5%; $p= 0.270$). Diese Beobachtung kehrte sich nach fünf Jahren um, verhielt sich jedoch weiterhin nicht signifikant (DSA+ 66.5% vs. DSA- 57.7%; $p= 0.339$).

Beide Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in der Anzahl der nachfolgend durchgeführten Re-Transplantationen (DSA+: $n=6$, 5.3% vs. DSA-: $n=11$, 9.7%; $p= 0.207$).

5.3. Subgruppenanalyse der DSA+ Kohorte

Insgesamt waren die DSA bei 47 Patienten (41.6%) ausschließlich der Klasse I zuzuordnen, 31 Patienten (27.4%) hatten sowohl DSA der Klasse I als auch II. Patienten mit ausschließlich präformierten DSA hatten vornehmlich DSA der Klasse I ($n=32$, 65.3%), diejenigen mit ausschließlich *de novo*-DSA hatten in den meisten Fällen DSA der Klasse II ($n=28$, 50.9%). In der Gruppe der Patienten mit *de novo*-DSA ($n=55$) war der Anteil männlicher Patienten signifikant höher als in der Gruppe mit präformierten DSA ($n=49$) [$n=40$ (72.7%) vs. $n=17$ (34.7%); $p < 0.001$].

Die LT-Empfänger mit präformierten DSA hatten ein signifikant niedrigeres Patientenüberleben im ersten postoperativen Jahr als die Patienten der gematchten DSA- Gruppe (67.4% vs. 84.8%; $p= 0.008$). Dieser Effekt war noch ausgeprägter bei Patienten mit präformierten DSA und einem maximalen MFI-Wert (MFI_{max}) von ≥ 5000 ($n= 19$, 63.2% vs. 84.8%, $p= 0.022$).

Auch das Transplantatüberleben war in dieser Gruppe niedriger (DSA+ 65.3% vs. DSA- 79.5%; $p= 0.062$).

Patienten mit *de novo*-DSA zeigten zu keinem untersuchten Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied im Patienten- oder Organüberleben gegenüber der gematchten DSA- Gruppe, unabhängig von der Höhe des MFI_{max}.

LT-Empfänger mit präformierten DSA verstarben in den meisten Fällen an Sepsis ($n=7$, 6.2%). Diese trat verglichen mit der gematchten DSA- Gruppe signifikant häufiger auf ($n=2$, 1.8%; $p= 0.031$). Bezüglich der Verteilung anderer Todesursachen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit präformierten bzw. *de novo*-DSA sowie der gematchten DSA- Gruppe.

5.4. Abstoßungen und Abstoßungstherapien – Vergleich der gematchten Kohorten

Leberbiopsien wurden im ersten postoperativen Jahr bei 72 DSA+ (63.7%) und 35 DSA- Patienten (31%, $p < 0.001$) durchgeführt. Eine ABMR wurde bei zwei (1.8%) DSA+ und keinem

DSA- Patienten ($p= 0.155$) histologisch nachgewiesen. Eine TCMR wurde bei 59 (52.2%) der DSA+ und 34 DSA- Patienten histologisch gesichert (30.1%, $p< 0.001$).

DSA+ Patienten erhielten signifikant häufiger eine Abstoßungstherapie als DSA- Patienten [$n=77$ (68.1%) vs. $n=37$ (32.7%), $p< 0.001$]. Diese bestand zumeist aus einer Kombination aus Corticosteroiden und der Erhöhung der Standard-IS [DSA+ $n=70$ (61.9%) vs. DSA- $n=37$ (32.7%); $p< 0.001$]. Insgesamt wurden 71 (62.8%) DSA+ und 37 (32.7%) DSA- LT-Empfänger auf eine TCMR hin behandelt ($p< 0.001$). Eine ABMR-Therapie mittels PP/IVIG erhielten 41 (36.3%) der DSA+ und 2 (1.8%) der DSA- Patienten ($p< 0.001$). Insgesamt erhielt ein DSA+ Patient innerhalb des perioperativen Aufenthalts Rituximab (0.8% vs. DSA- 0%, $p= 0.061$).

In der DSA+ Gruppe wurden sechs (5.3%), in der DSA- Gruppe drei Patienten (2.7%, $p= 0.307$) ohne histologischen Nachweis unter dem Verdacht einer TCMR therapiert. Bei Verdacht auf eine therapierefraktäre Abstoßung und bekannten präformierten DSA erhielten zwei (1.8%) dieser DSA+ Patienten zusätzlich eine erweiterte Therapie mittels PP/IVIG. Ein DSA+ Empfänger (0.9%) mit präformierten DSA erhielt eine Therapie mit PP/IVIG ohne bioptische Sicherung.

Die mediane Zeit bis zum Beginn einer Abstoßungstherapie war in beiden Gruppen vergleichbar [DSA+ 9.5 (6-17) Tage vs. DSA- 9 (7-23) Tage; $p= 0.214$].

Der Anteil an durchgeführten TCMR- ($p= 0.093$) oder ABMR-Therapien ($p= 0.691$) zeigte geringe Unterschiede zwischen der Gruppe mit ausschließlich präformierten bzw. *de novo*-DSA. LT-Empfänger mit *de novo*-DSA wurden signifikant häufiger bei histologisch gesicherter TCMR behandelt ($n=35$, 63.6%) als Patienten mit präformierten DSA ($n=19$, 38.8%, $p= 0.011$) oder DSA-Patienten ($n=34$, 30.1%, $p< 0.001$). Beide Gruppen zeigten jedoch keinen Unterschied in der Anwendungshäufigkeit der anderen Abstoßungstherapien.

Bei LT-Empfängern mit präformierten DSA war die mediane Zeit bis zum Beginn einer Abstoßungstherapie signifikant kürzer als bei Patienten mit *de novo*-DSA [6 (5–16) vs. 11.5 (7–18) Tage; $p= 0.024$] oder Patienten ohne DSA [9 (7-23) Tage, $p= 0.003$].

6. Diskussion

Der Stellenwert von DSA in der LT wird seit Jahren kontrovers diskutiert und Daten bezüglich ihres Einflusses auf den klinischen Verlauf sind beschränkt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass insbesondere präformierte DSA bei LT-Empfängern mit einem reduzierten Patientenüberleben innerhalb des ersten postoperativen Jahres einhergehen. Dies scheint insbesondere auf das erhöhte Risiko für einen Tod durch Sepsis zurückzuführen zu sein. Die erfassten Daten lassen darauf schließen, dass DSA bei Erwachsenen einen indirekten Effekt

auf den Ausgang von LTs haben könnten, da sie die Diagnosestellung und therapeutische Entscheidungen bei möglichen Abstoßungsreaktionen beeinflussen.

Um eine weitestgehend homogene Studienpopulation hinsichtlich demographischer und klinischer Parameter zu erhalten, eliminierten wir zunächst Faktoren, die mit einem schlechteren Verlauf der LT einhergehen. Diese Faktoren umfassen high urgency-, Multiviszeral- und Re-Transplantationen⁵⁷⁻⁵⁹. Des Weiteren wurde ein 1:1 Matching durchgeführt, um jedem DSA+ Patienten einen hinsichtlich der LT-Prognose vergleichbaren DSA- Patienten zuzuordnen. Hierfür wurde der BAR-Score herangezogen, da dieser aktuell im Vergleich zu anderen etablierten Scores (u.a. MELD-, DRI oder SOFT-Score) die insgesamt beste Vorhersage hinsichtlich Mortalität und Morbidität nach LT erreicht^{51, 60, 61}. Bezüglich des Patientenüberlebens scheint er zwar dem SOFT-Score (survival outcome following liver transplant) oder dem DRM (donor to recipient model) zu unterliegen⁶², ist jedoch aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl von sechs Elementen (vgl. DRM 13, SOFT 18) sehr praktikabel. Er integriert neben dem MELD-Score weitere prognosebestimmende Empfänger-, Spender- und Transplantatkriterien⁵¹. Eine weitere wichtige Voraussetzung war die Untersuchung einer Studienpopulation, die auf einem einheitlichen Testverfahren basiert, in diesem Fall dem Luminex[®]-Verfahren. Seit über zehn Jahren hat es sich als Verfahren mit der höchsten Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu älteren Methoden wie dem Zytotoxizitäts-Test (CDC – complement dependent cytotoxicity) oder ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bewährt^{49, 63}. Es ermöglicht eine detaillierte Spezifizierung von HLA-Antikörpern, die zu einem tieferen Verständnis der Pathophysiologie und Immunhistologie von DSA geführt hat.

Die in dieser Studie ermittelte Inzidenz der DSA (22.2%) liegt innerhalb der zuvor publizierten Spannweite. Der Anteil von 9.6% der Patienten mit präformierten und 10.8% mit *de novo*-DSA ist vergleichbar mit den Zahlen vorangegangener Studien (präformiert: 4.7-22.2%^{37, 39, 64}; *de novo*: 8-19.9%^{36, 39, 41, 43}). Wie bei einigen anderen Autoren wurde gemäß den Kriterien des untersuchenden Labors ein MFI-Wert von >1000 als DSA-Positivität festgelegt^{33, 35, 41}. Dieser Schwellenwert befindet sich im unteren Bereich zuvor publizierter Werte (z.B. Musat *et al.* 300³⁸, Koch *et al.* ≥1500⁴⁰, Taner *et al.* ≥2000⁶⁴, Kaneku *et al.* ≥5000⁴³). Da in dieser Studie der Fokus auf dem Einfluss der Präsenz von DSA lag, erfolgte keine weitere Anpassung des Wertes.

In der Verteilung der Antikörper-Klassen zeigte sich eine Prädominanz von Klasse I-DSA bei den präformierten-, und Klasse II bei *de novo*-DSA. Eine Prädominanz der Antikörper-Klasse II bei *de novo*-DSA wurde bereits in der Vergangenheit beschrieben^{39, 42, 43, 65}. Eine mögliche Erklärung dessen wäre die Hochregulation von HLA-Klasse II-Molekülen in der Leber im Rahmen inflammatorischer Prozesse wie eingangs beschrieben^{19, 20}. Demgegenüber kann das Vorherrschen von Klasse I bei präformierten DSA aktuell nicht hinreichend erklärt werden, und

Zahlen in der Literatur weichen voneinander ab: Von 184 Patienten mit präformierten DSA aus einer Studie von O'Leary *et al.* hatten n=84 (45.7%) Klasse I- und n=50 (27.2%) Klasse II-DSA³⁷. Tamura *et al.*⁶⁶ berichteten von 6/8 (75%) Patienten mit präformierten DSA der Klasse II, und keinem mit ausschließlich Klasse I-DSA. Bei Vandevorode *et al.*³⁹ registrierte man 14 Patienten mit präformierten DSA, von denen n=3 (21.4%) Klasse I- und n=5 (35.7%) Klasse II-DSA hatten.

In Konkordanz zu den *Eurotransplant*-Daten stellten auch in unserer Studienkohorte die alkoholische Zirrhose an erster, und das HCC an zweiter Stelle die häufigste Indikation zur LT dar⁷. AILD sowie eine kryptogene Zirrhose oder NASH wurden in der DSA+ Gruppe häufiger als LT-Indikation festgestellt. Hierbei zeigte sich kein negativer Einfluss auf den klinischen Verlauf nach LT. Einige Studien zeigten in der Vergangenheit sogar eher gute Ergebnisse hinsichtlich des Patienten- und Transplantatüberlebens der letzteren Patientengruppe⁶⁷⁻⁶⁹. Dies traf auch auf unsere Studienkohorte zu (85.7% Patientenüberleben nach einem und fünf Jahren). DSA+ Patienten mit AILD zeigten ein deutlich niedrigeres Patientenüberleben gegenüber AILD-Patienten ohne DSA nach einem und fünf Jahren (zu beiden Zeitpunkten 76.9% vs. 100%, p= 0.156). Dieser Unterschied erreichte am ehesten aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Signifikanz, könnte jedoch auf ein möglicherweise erhöhtes immunologisches Risiko dieser Patientengruppe hinweisen.

Der BAR-Score beider Gruppen (DSA+ und DSA-) lag weit unter dem für das Patientenüberleben relevanten Schwellenwert von 18 und entsprach dem von Dutkowski *et al.* publizierten Median⁵¹.

Trotz der insgesamt deutlichen Mehrheit männlicher LT-Empfänger in der Studienkohorte (n=344, 67.5%) observierten wir in unserer Analyse einen signifikant erhöhten Anteil an Frauen in der DSA+ Gruppe im Vergleich zur DSA- Kontrolle. Besonders ausgeprägt war dieser Unterschied bei LT-Empfängern mit präformierten DSA. Diese Beobachtung wurde bereits in vergangenen Publikationen gemacht^{37, 38, 64}. Eine Erklärung dafür ist eine Sensibilisierung durch vorangegangene Schwangerschaften, die ein maßgeblicher Auslöser für die Bildung von anti-HLA-Antikörpern sind⁷⁰⁻⁷³.

Eine weitere Beobachtung war die signifikant geringere Rate alkoholischer Zirrhose als LT-Indikation in der DSA+ Gruppe. Für LT-Empfänger liegen bezüglich eines geringeren Vorkommens von anti-HLA-Antikörpern bei Alkoholkonsum keine Daten vor. Des Weiteren liegt die Rate weiterhin deutlich über dem vom *ELTR* (*European Liver Transplant Registry*) veröffentlichten Prozentsatz von 19%⁶, sodass es sich hierbei am ehesten um ein epidemiologisches als um ein immunologisches Phänomen handelt.

Unter den Geschlechter-bezogenen Ergebnissen zeigte sich ein F-M Mismatch häufiger in der DSA- Kohorte. Obwohl es in der Vergangenheit als möglicher Risikofaktor für ein Transplantatversagen beschrieben wurde⁷⁴, zeigte unsere DSA- Kohorte ein besseres

Transplantat- und Patientenüberleben. Ein F-M Mismatch schien daher in dieser Studienpopulation keinen relevanten Einfluss darauf zu haben. Auch unter den Empfängern mit F-M Mismatch zeigten nur die Patienten mit präformierten DSA ein signifikant reduziertes Patienten- (**p= 0.004**) und Transplantatüberleben (**p= 0.001**). Interessanterweise assoziierten Vandevorde *et al.* ein F-M Mismatch mit dem Vorhandensein von DSA ³⁹.

Die DSA+ Patienten wiesen in unserer Analyse eine signifikant kürzere CIT und WIT im Vergleich zur DSA- Kontrollgruppe auf. Der Anstieg beider Parameter ist assoziiert mit einem längeren stationären Aufenthalt nach LT ⁷⁵, sowie einer Beeinträchtigung des Transplantationserfolgs ^{57, 76, 77}. Die DSA+ Gruppe wies jedoch nicht nur einen signifikant längeren stationären, sondern auch intensivstationären Aufenthalt auf. Ebenfalls zeigte sich ein schlechteres Kurzzeit-Überleben als in der DSA- Gruppe. Der längere Krankenhaus-Aufenthalt war insbesondere mit der protrahierten Abstoßungstherapie verbunden.

Die Leberfunktionsparameter ähnelten sich in beiden Gruppen, jedoch gab es zu unterschiedlichen Zeitpunkten drei signifikant voneinander abweichende Parameter, die klinisch gesehen in keinem relevanten Zusammenhang standen. Eine mögliche Bewertung dieser Ergebnisse ist, dass DSA keinen direkten Effekt auf die Leberfunktionsparameter zeigen, bzw. deren routinemäßige Abnahme unter Umständen nicht für die Darstellung der Auswirkungen einer DSA-Präsenz geeignet sind.

In dieser Studie erhoben wir einen nicht-signifikanten Unterschied im Ein-Jahres-Patientenüberleben zwischen der DSA+ und der gematchten DSA- Gruppe (**p= 0.053**). In der Subgruppenanalyse ergab sich hingegen ein signifikant herabgesetztes Patientenüberleben in diesem Zeitraum bei Patienten mit präformierten DSA im Vergleich zur DSA- Kontrollgruppe (**p= 0.008**). Dies war weder nach drei noch fünf Jahren der Fall. O'Leary *et al.* konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen präformierten DSA und der Patienten-Mortalität zeigen ³⁷. Auch in unserer Kohorte zeigten Patienten mit präformierten DSA und hohem MFI-Wert (≥ 5000) einen noch deutlicheren Unterschied im Patientenüberleben, verglichen mit der DSA- Kontrollgruppe (**p= 0.022**). Tamura *et al.* ⁶⁶ beschrieben erst kürzlich ein reduziertes Patientenüberleben innerhalb der ersten 90 Tage bei LT-Empfängern mit präformierten DSA nach Leber-Lebendspende.

Eine Studie von Kaneku *et al.* zeigte zudem, dass auch *de novo*-DSA einen schädigenden Einfluss auf das Patienten- und Transplantatüberleben innerhalb des ersten Jahres nach LT haben ⁴³. In unserer Studienkohorte hingegen zeigte sich das Patientenüberleben der LT-Empfänger mit *de novo*-DSA vergleichbar zur DSA- Kontrollgruppe. Einige Autoren konnten indes keinen negativen Effekt von DSA hinsichtlich des Patientenüberlebens nach LT feststellen ^{39, 40}. Wichtig ist hervorzuheben, dass diese Forschungsergebnisse meist auf der Untersuchung

heterogener Patientengruppen basieren. Gründe sind beispielsweise eine gemeinsame Auswertung von erstmaligen LTs, Re-LTs sowie LTs nach Leber-Lebendspende, unterschiedlich große Studienpopulationen, uneinheitliche Methoden der DSA-Bestimmung sowie das Fehlen einer einheitlichen Definition der ABMR in der LT.

Die vorliegende Studie beinhaltet dabei eine der bisher höchsten untersuchten Fallzahlen und den aktuellsten Untersuchungszeitraum. Das Studiendesign umfasste zudem ausschließlich über das Luminex[®]-Verfahren detektierte HLA. Unsere Ergebnisse unterstützen die Vermutungen zum negativen Einfluss von DSA auf den Verlauf der LT in Bezug auf das Patientenüberleben innerhalb des ersten postoperativen Jahres.

Hervorzuheben ist, dass in der DSA+ Gruppe signifikant mehr Leberbiopsien durchgeführt und bei signifikant mehr Patienten eine TCMR diagnostiziert wurde als in der DSA- Gruppe. Eine größere Anzahl an DSA+ Patienten erhielt zudem ohne histologisch gesicherte Diagnose eine Abstoßungstherapie.

Ein besonders auffälliges Ergebnis dieser Studie ist, dass DSA+ Patienten nicht nur signifikant häufiger, sondern auch früher aufgrund einer (vermuteten) Abstoßung therapiert wurden. LT-Empfänger mit präformierten DSA wurden in einer hoch sensiblen Phase innerhalb der ersten Woche nach LT behandelt. Insbesondere in Fällen mit unklarer oder steroid-refraktärer Verschlechterung der Leberfunktion, sowie uneindeutigen oder fehlenden Biopsiebefunden, erfolgte bei Vorliegen von DSA eine Erweiterung der Abstoßungstherapie unter klinischem Verdacht. Die Haupttodesursache in der DSA+ Gruppe war interessanterweise die Sepsis, welche signifikant häufiger auftrat als in der DSA- Gruppe. Auch Koch *et al.* beschrieben die Sepsis als Haupt-Todesursache bei DSA+ Patienten, allerdings über einen Zeitraum von drei Jahren nach LT⁴⁰. Alle elf DSA+ Patienten unserer Studie, die an Sepsis verstarben, erhielten eine immunsuppressive Therapie bestehend aus entweder IVIG, PP, ATG, Rituximab oder der Kombination aus mindestens zwei der genannten.

Diese Beobachtung wurde in der aktuellen Debatte über die Rolle der DSA in der LT bisher noch nicht beschrieben. Eine Einleitung oder Erweiterung der immunsuppressiven Therapie bei DSA+ Patienten bei unklarer reduzierter oder verzögerter Transplantatfunktion könnte zu einer erhöhten Mortalität durch infekt-assoziierte Komplikationen führen. Dieser Effekt scheint sich insbesondere im ersten postoperativen Jahr zu manifestieren, da zu diesem Zeitpunkt auch eine höhere Vulnerabilität der Transplantat-Empfänger vorliegt. Der mittel- und langfristige Verlauf ist diesbezüglich jedoch gegenüber DSA- Patienten vergleichbar.

Die vorliegende Studie unterliegt einigen Limitationen. Das retrospektive Design einer Fall-Kontroll-Studie sowie die Durchführung als Single-Center-Studie unterliegen einem Bias, sodass unsere Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf alle LTs übertragen werden können. Insbesondere

mit den high urgency- sowie re-transplantierten Empfängern wurde eine wichtige Patientengruppe ausgeschlossen. Dennoch wurde beispielsweise ein Selektionsbias durch das Matching weitestgehend umgangen. Durch die Beschränkung auf eine einzige DSA-Detektionsmethode, sowie den Ausschluss der Patienten mit bekannten Risikofaktoren für einen schlechteren Verlauf, konnte auch innerhalb der DSA+ Gruppe eine geringere Heterogenität erreicht werden.

Darüber hinaus liegt der in dieser Studie gewählte MFI-Schwellenwert von >1000 im unteren Bereich der zuvor publizierten Werte. Auch hierin besteht ein möglicher Selektionsbias. Allerdings gibt es bisher keinen internationalen Konsens über einen standardisierten MFI-Schwellenwert, und überdies lag der in unserer Studie erfasste mediane MFI_{max} deutlich über der Detektionsschwelle [4332 (1470-7336)].

Zu nennen ist weiterhin, dass das Matching anhand des BAR-Scores bis dato keine etablierte und validierte Methode darstellt. Auch dies kann zu einem Selektionsbias führen, wengleich der BAR-Score einen hohen prädiktiven Wert hinsichtlich des Patientenüberlebens nach LT hat.

Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns war eine Rekonstruktion der jeweiligen Therapie-Entscheidungen schwierig. So wurden beispielsweise einige Patienten „ex juvantibus“ therapiert. Unterschiede innerhalb des Untersuchungszeitraums hinsichtlich der Interpretation der DSA-Befunde bzw. angewandter therapeutischer Methoden können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Hürde war das Fehlen einheitlicher (histologischer) ABMR-Kriterien bis 2016. So wurden Leberbiopsien vor 2017 nur selten mittels C4d-Färbung untersucht, eine Reevaluation der Proben erfolgte durch unsere Arbeitsgruppe nicht. Dies hätte zwar womöglich einen tieferen Einblick in das pathophysiologische Verständnis von DSA in der LT erbracht, jedoch keinen Einfluss auf die vergangenen Therapie-Entscheidungen gehabt. Es ist festzuhalten, dass wahrscheinlich weniger die tatsächliche ABMR, sondern eher das Vorhandensein bzw. die Befürchtung DSA-assoziiertes Abstoßungen zu einer intensiveren Immunsuppression und somit erhöhten Mortalität geführt haben.

Aus methodischen Gründen erfolgte keine weitere Aufschlüsselung hinsichtlich DSA-Subklassen oder Komplement-bindender DSA. Zudem verzichteten wir auf eine weitere Analyse der erhobenen Daten nach DSA-(Sub-)Klassen, um den Fokus der Arbeit zu wahren und einen Typ-I-Fehler zu vermeiden. Insgesamt ist auch die relativ niedrige Fallzahl der Studie zu berücksichtigen.

Trotz der genannten Limitationen konnten wir wichtige Erkenntnisse bezüglich des Stellenwerts von DSA auf den klinischen Verlauf nach orthotoper LT gewinnen. Die Bereitschaft zur Einleitung/Erweiterung einer Abstoßungstherapie bei uneindeutigen histologischen Befunden und/oder unklarer Verschlechterung der Transplantatfunktion scheint weit höher zu sein, wenn DSA vorliegen. Einen wichtigen Einfluss hat hierbei insbesondere das Fehlen standardisierter

diagnostischer und therapeutischer Leitlinien. Obgleich ein immunologischer Effekt durch DSA nicht ausgeschlossen werden kann, scheint die beobachtete Auswirkung auf das Kurzzeit-Überleben offenbar am ehesten auf infekt-assoziierte Komplikationen infolge einer immunsuppressiven (Über-)Therapie zu beruhen.

Zusammenfassend sollte bei Verdacht auf ABMR eine sorgfältige diagnostische Abklärung erfolgen, bevor eine Therapie begonnen oder intensiviert wird. Die weitergehende Erforschung pathophysiologischer und immunhistologischer Prozesse von DSA in der LT unter vergleichbaren Standards ist notwendig. Um herauszufinden, ob oder welche LT-Empfänger von einer DSA-Bestimmung bzw. ABMR-Therapie profitieren, ist es nötig einen Konsens bezüglich der Handhabung von MFI-Schwellenwerten, Bestimmung von DSA-Subklassen sowie insbesondere ABMR-Leitlinien zu definieren.

7. Literaturverzeichnis

1. European Liver Transplant Registry. Evolution of LTs in Europe. Number of LTs per country. Villejuif, France. Abgerufen am 05.02.2021. Available at: <http://www.eltr.org/Evolution-of-LTs-in-Europe.html>
2. Eurotransplant Foundation International. Annual Report 2019. The Hague, 26.05.2020. Abgerufen am 08.08.2020.
3. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2019. Frankfurt am Main, April 2020. Abgerufen am 08.08.2020.
4. Organ Procurement and Transplantation Network. <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/> Transplants by Donor Type. For Organ = Liver, Format: Portrait. Based on OPTN data as of November 17, 2020. Abgerufen am 18.11.2020.
5. Trotter JF. Liver transplantation around the world. *Curr Opin Organ Transplant* 2017; 22(2):123-127.
6. Adam R, Karam V, Cailliez V, JG OG, Mirza D, Cherqui D, Klempnauer J, Salizzoni M, Pratschke J, Jamieson N, Hidalgo E, Paul A, Andujar RL, Lerut J, Fisher L, Boudjema K, Fondevila C, Soubrane O, Bachellier P, Pinna AD, Berlakovich G, Bennet W, Pinzani M, Schemmer P, Zieniewicz K, Romero CJ, De Simone P, Ericzon BG, Schneeberger S, Wigmore SJ, Prous JF, Colledan M, Porte RJ, Yilmaz S, Azoulay D, Pirenne J, Line PD, Trunecka P, Navarro F, Lopez AV, De Carlis L, Pena SR, Kochs E, Duvoux C, all the other 126 contributing c, the European L, Intestine Transplant A. 2018 Annual Report of the European Liver Transplant Registry (ELTR) - 50-year evolution of liver transplantation. *Transpl Int* 2018; 31(12):1293-1317.
7. Jochmans I, van Rosmalen M, Pirenne J, Samuel U. Adult Liver Allocation in Eurotransplant. *Transplantation* 2017; 101(7):1542-1550.
8. Holmer M, Melum E, Isoniemi H, Ericzon BG, Castedal M, Nordin A, Aagaard Schultz N, Rasmussen A, Line PD, Stal P, Bennet W, Hagstrom H. Nonalcoholic fatty liver disease is an increasing indication for liver transplantation in the Nordic countries. *Liver Int* 2018; 38(11):2082-2090.
9. Tacke F, Kroy DC, Barreiros AP, Neumann UP. Liver transplantation in Germany. *Liver Transpl* 2016; 22(8):1136-42.
10. Deutsches Transplantationsgesetz. <https://www.gesetze-im-internet.de/tpg/TPG.pdf> ; abgerufen am 16.11.2020.
11. Bundesärztekammer. Richtlinien zur Organtransplantation gemäß § 16 TPG. https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/RL/RiliOrgaWIOvLeberTx20190924.pdf ; abgerufen am 18.11.2020.
12. Eurotransplant Foundation International. Eurotransplant Manual Version 5.15, Chapter 5 - ET Liver Allocation System (ELAS). Eurotransplant Foundation International. Leiden, The Netherlands; September 2019.
13. Benacerraf B. Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 1981; 212(4500):1229-38.
14. Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(1):85-96.
15. Schwartz RH. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1985; 3:237-61.
16. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:419-66.
17. McCluskey J, Kanaan C, Diviney M. Nomenclature and Serology of HLA Class I and Class II Alleles. *Curr Protoc Immunol* 2017; 118:A 1S 1-A 1S 6.
18. Boegel S, Lower M, Bukur T, Sorn P, Castle JC, Sahin U. HLA and proteasome expression body map. *BMC Med Genomics* 2018; 11(1):36.

19. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Groszpiere B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994; 265(5168):106-9.
20. Steinhoff G, Wonigeit K, Pichlmayr R. Analysis of sequential changes in major histocompatibility complex expression in human liver grafts after transplantation. *Transplantation* 1988; 45(2):394-401.
21. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280(14):735-9.
22. Stiller CR, Sinclair NR, Abrahams S, Ulan RA, Fung M, Wallace AC. Lymphocyte-dependent antibody and renal graft rejection. *Lancet* 1975; 1(7913):953-4.
23. Demetris AJ, Jaffe R, Tzakis A, Ramsey G, Todo S, Belle S, Esquivel C, Shapiro R, Markus B, Mroczek E, Van Thiel DH, Sysyn G, Gordon R, Makowka L, Starzl T. Antibody-mediated rejection of human orthotopic liver allografts. A study of liver transplantation across ABO blood group barriers. *Am J Pathol* 1988; 132(3):489-502.
24. Ogura K, Koyama H, Takemoto S, Terasaki PI, Busuttil RW. Significance of a positive crossmatch on outcome in human liver transplantation. *Transplant Proc* 1992; 24(4):1465.
25. Nakamura K, Murase N, Becich MJ, Furuya T, Todo S, Fung JJ, Starzl TE, Demetris AJ. Liver allograft rejection in sensitized recipients. Observations in a clinically relevant small animal model. *Am J Pathol* 1993; 142(5):1383-91.
26. Davies HS, Pollard SG, Calne RY. Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients. *Transplantation* 1989; 47(3):524-7.
27. Gugenheim J, Le Thai B, Rouger P, Gigou M, Gane P, Vial MC, Charpentier B, Reynes M, Bismuth H. Relationship between the liver and lymphocytotoxic alloantibodies in inbred rats. Specific absorption by nonparenchymal liver cells. *Transplantation* 1988; 45(2):474-8.
28. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Danjoux M, Muscari F, Kamar N. Donor-specific antibodies and liver transplantation. *Hum Immunol* 2016; 77(11):1063-1070.
29. Takacs L, Szende B, Monostori E, Rot A, Lapis K, Szecseny A, Ando I. Expression of HLA-DR antigens on bile duct cells of rejected liver transplant. *Lancet* 1983; 2(8365-66):1500.
30. Knechtle SJ, Kolbeck PC, Tsuchimoto S, Coundouriotis A, Sanfilippo F, Bollinger RR. Humoral rejection of rat hepatic transplants by passive transfer of serum. *Transplant Proc* 1987; 19(1 Pt 2):1072-6.
31. Jiang X, Morita M, Sugioka A, Harada M, Kojo S, Wakao H, Watarai H, Ohkohchi N, Taniguchi M, Seino K. The importance of CD25+ CD4+ regulatory T cells in mouse hepatic allograft tolerance. *Liver Transpl* 2006; 12(7):1112-8.
32. Demetris AJ, Bellamy C, Hubscher SG, O'Leary J, Randhawa PS, Feng S, Neil D, Colvin RB, McCaughan G, Fung JJ, Del Bello A, Reinholt FP, Haga H, Adeyi O, Czaja AJ, Schiano T, Fiel MI, Smith ML, Sebach M, Tanigawa RY, Yilmaz F, Alexander G, Baiocchi L, Balasubramanian M, Batal I, Bhan AK, Bucuvalas J, Cerski CTS, Charlotte F, de Vera ME, ElMonayeri M, Fontes P, Furth EE, Gouw ASH, Hafezi-Bakhtiari S, Hart J, Honsova E, Ismail W, Itoh T, Jhala NC, Khettry U, Klintmalm GB, Knechtle S, Koshiha T, Kozlowski T, Lassman CR, Lerut J, Levitsky J, Licini L, Liotta R, Mazariegos G, Minervini MI, Misdraji J, Mohanakumar T, Molne J, Nasser I, Neuberger J, O'Neil M, Pappo O, Petrovic L, Ruiz P, Sagol O, Sanchez Fueyo A, Sasatomi E, Shaked A, Shiller M, Shimizu T, Sis B, Sonzogni A, Stevenson HL, Thung SN, Tisone G, Tsamandas AC, Wernerson A, Wu T, Zeevi A, Zen Y. 2016 Comprehensive Update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant* 2016; 16(10):2816-2835.
33. O'Leary JG, Kaneku H, Demetris AJ, Marr JD, Shiller SM, Susskind BM, Tillery GW, Terasaki PI, Klintmalm GB. Antibody-mediated rejection as a contributor to previously unexplained early liver allograft loss. *Liver Transpl* 2014; 20(2):218-27.
34. Kaneku H, O'Leary JG, Taniguchi M, Susskind BM, Terasaki PI, Klintmalm GB. Donor-specific human leukocyte antigen antibodies of the immunoglobulin G3 subclass are

- associated with chronic rejection and graft loss after liver transplantation. *Liver Transpl* 2012; 18(8):984-92.
35. O'Leary JG, Kaneku H, Susskind BM, Jennings LW, Neri MA, Davis GL, Klintmalm GB, Terasaki PI. High mean fluorescence intensity donor-specific anti-HLA antibodies associated with chronic rejection Postliver transplant. *Am J Transplant* 2011; 11(9):1868-76.
 36. O'Leary JG, Kaneku H, Banuelos N, Jennings LW, Klintmalm GB, Terasaki PI. Impact of IgG3 subclass and C1q-fixing donor-specific HLA alloantibodies on rejection and survival in liver transplantation. *Am J Transplant* 2015; 15(4):1003-13.
 37. O'Leary JG, Kaneku H, Jennings LW, Banuelos N, Susskind BM, Terasaki PI, Klintmalm GB. Preformed class II donor-specific antibodies are associated with an increased risk of early rejection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2013; 19(9):973-80.
 38. Musat AI, Pigott CM, Ellis TM, Agni RM, Levenson GE, Powell AJ, Richards KR, D'Alessandro AM, Lucey MR. Pretransplant donor-specific anti-HLA antibodies as predictors of early allograft rejection in ABO-compatible liver transplantation. *Liver Transpl* 2013; 19(10):1132-41.
 39. Vandevoorde K, Ducreux S, Bosch A, Guillaud O, Hervieu V, Chambon-Augoyard C, Poinot D, Andre P, Scoazec JY, Robinson P, Boillot O, Dubois V, Dumortier J. Prevalence, risk factors, and impact of donor-specific alloantibodies after adult liver transplantation. *Liver Transpl* 2018.
 40. Koch M, Marget M, Sterneck M, Fischer L, Thude H, Nashan B. Limited impact of pre-existing donor specific HLA-antibodies (DSA) on long term allograft survival after first adult liver transplantation. *Hum Immunol* 2018; 79(7):545-549.
 41. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Danjoux M, Muscari F, Lavyssiere L, Esposito L, Cardeau-Desangles I, Guitard J, Dorr G, Milongo D, Suc B, Duffas JP, Alric L, Bureau C, Guilbeau-Frugier C, Rostaing L, Kamar N. De novo donor-specific anti-HLA antibodies mediated rejection in liver-transplant patients. *Transpl Int* 2015; 28(12):1371-82.
 42. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Muscari F, Lavyssiere L, Esposito L, Cardeau-Desangles I, Guitard J, Dorr G, Suc B, Duffas JP, Alric L, Bureau C, Danjoux M, Guilbeau-Frugier C, Blancher A, Rostaing L, Kamar N. Prevalence, incidence and risk factors for donor-specific anti-HLA antibodies in maintenance liver transplant patients. *Am J Transplant* 2014; 14(4):867-75.
 43. Kaneku H, O'Leary JG, Banuelos N, Jennings LW, Susskind BM, Klintmalm GB, Terasaki PI. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant* 2013; 13(6):1541-8.
 44. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003; 75(7):1034-40.
 45. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet* 2011; 378(9800):1428-37.
 46. Hodges AM, Lyster H, McDermott A, Rice AJ, Smith JD, Rose ML, Banner NR. Late antibody-mediated rejection after heart transplantation following the development of de novo donor-specific human leukocyte antigen antibody. *Transplantation* 2012; 93(6):650-6.
 47. Levine DJ, Glanville AR, Aboyoun C, Belperio J, Benden C, Berry GJ, Hachem R, Hayes D, Jr., Neil D, Reinsmoen NL, Snyder LD, Sweet S, Tyan D, Verleden G, Westall G, Yusen RD, Zamora M, Zeevi A. Antibody-mediated rejection of the lung: A consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2016; 35(4):397-406.
 48. de Kort H, Mallat MJ, van Kooten C, de Heer E, Brand-Schaaf SH, van der Wal AM, Roufosse C, Roelen DL, Bruijn JA, Claas FH, de Fijter JW, Bajema IM. Diagnosis of early pancreas graft failure via antibody-mediated rejection: single-center experience with 256 pancreas transplantations. *Am J Transplant* 2014; 14(4):936-42.

49. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schonemann C. Luminex((R)) and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus Med Hemother* 2013; 40(3):182-9.
50. Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, Reed EF, Bray RA, Campbell P, Chapman JR, Coates PT, Colvin RB, Cozzi E, Doxiadis, II, Fuggle SV, Gill J, Glotz D, Lachmann N, Mohanakumar T, Suci-Foca N, Sumitran-Holgersson S, Tanabe K, Taylor CJ, Tyan DB, Webster A, Zeevi A, Opelz G. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013; 95(1):19-47.
51. Dutkowski P, Oberkofler CE, Slankamenac K, Puhan MA, Schadde E, Mullhaupt B, Geier A, Clavien PA. Are there better guidelines for allocation in liver transplantation? A novel score targeting justice and utility in the model for end-stage liver disease era. *Ann Surg* 2011; 254(5):745-53; discussion 753.
52. Cameron AM, Sullivan BE. Regulatory oversight in transplantation: there and back again. *JAMA Surg* 2013; 148(11):997-8.
53. Leppke S, Leighton T, Zaun D, Chen SC, Skeans M, Israni AK, Snyder JJ, Kasiske BL. Scientific Registry of Transplant Recipients: collecting, analyzing, and reporting data on transplantation in the United States. *Transplant Rev (Orlando)* 2013; 27(2):50-6.
54. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R, United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score C. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124(1):91-6.
55. Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DeRoy MA, Greenstein SM, Merion RM. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am J Transplant* 2006; 6(4):783-90.
56. Demetris A, Adams D, Bellamy C, Blakolmer K, Clouston A, Dhillon AP, Fung J, Gouw A, Gustafsson B, Haga H, Harrison D, Hart J, Hubscher S, Jaffe R, Khettry U, Lassman C, Lewin K, Martinez O, Nakazawa Y, Neil D, Pappo O, Parizhskaya M, Randhawa P, Rasoul-Rockenschaub S, Reinholt F, Reynes M, Robert M, Tsamandas A, Wanless I, Wiesner R, Wernerson A, Wrba F, Wyatt J, Yamabe H. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology* 2000; 31(3):792-9.
57. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20(4 Pt 1):829-38.
58. Brandsaeter B, Hockerstedt K, Friman S, Ericzon BG, Kirkegaard P, Isoniemi H, Olausson M, Broome U, Schmidt L, Foss A, Bjoro K. Fulminant hepatic failure: outcome after listing for highly urgent liver transplantation-12 years experience in the nordic countries. *Liver Transpl* 2002; 8(11):1055-62.
59. Rana A, Robles S, Russo MJ, Halazun KJ, Woodland DC, Witkowski P, Ratner LE, Hardy MA. The combined organ effect: protection against rejection? *Ann Surg* 2008; 248(5):871-9.
60. Dutkowski P, Oberkofler CE, Bechir M, Mullhaupt B, Geier A, Raptis DA, Clavien PA. The model for end-stage liver disease allocation system for liver transplantation saves lives, but increases morbidity and cost: a prospective outcome analysis. *Liver Transpl* 2011; 17(6):674-84.
61. Schlegel A, Linecker M, Kron P, Gyori G, De Oliveira ML, Mullhaupt B, Clavien PA, Dutkowski P. Risk Assessment in High- and Low-MELD Liver Transplantation. *Am J Transplant* 2017; 17(4):1050-1063.
62. de Boer JD, Putter H, Blok JJ, Alwayn IPJ, van Hoek B, Braat AE. Predictive Capacity of Risk Models in Liver Transplantation. *Transplant Direct* 2019; 5(6):e457.
63. Zachary AA, Vega RM, Lucas DP, Leffell MS. HLA antibody detection and characterization by solid phase immunoassays: methods and pitfalls. *Methods Mol Biol* 2012; 882:289-308.

64. Taner T, Gandhi MJ, Sanderson SO, Poterucha CR, De Goey SR, Stegall MD, Heimbach JK. Prevalence, course and impact of HLA donor-specific antibodies in liver transplantation in the first year. *Am J Transplant* 2012; 12(6):1504-10.
65. Jucaud V, Shaked A, DesMarais M, Sayre P, Feng S, Levitsky J, Everly MJ. Prevalence and Impact of De Novo Donor-Specific Antibodies During a Multicenter Immunosuppression Withdrawal Trial in Adult Liver Transplant Recipients. *Hepatology* 2019; 69(3):1273-1286.
66. Tamura K, Tohyama T, Watanabe J, Nakamura T, Ueno Y, Inoue H, Honjo M, Sakamoto K, Takai A, Ogawa K, Takada Y. Preformed donor-specific antibodies are associated with 90-day mortality in living-donor liver transplantation. *Hepatol Res* 2019.
67. Adam R, Karam V, Delvart V, O'Grady J, Mirza D, Klempnauer J, Castaing D, Neuhaus P, Jamieson N, Salizzoni M, Pollard S, Lerut J, Paul A, Garcia-Valdecasas JC, Rodriguez FS, Burroughs A, All contributing c, European L, Intestine Transplant A. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol* 2012; 57(3):675-88.
68. Ilyas JA, O'Mahony CA, Vierling JM. Liver transplantation in autoimmune liver diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25(6):765-82.
69. Thuluvath PJ, Hanish S, Savva Y. Liver Transplantation in Cryptogenic Cirrhosis: Outcome Comparisons Between NASH, Alcoholic, and AIH Cirrhosis. *Transplantation* 2018; 102(4):656-663.
70. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Audry B, Antoine C, Esposito L, Hebral AL, Kamar N. Impact of transplant accessibility for sensitized patients by avoiding unacceptable antigens. *Liver Transpl* 2017; 23(7):880-886.
71. Dumortier J, Dedic T, Erard-Poinsot D, Rivet C, Guillaud O, Chambon-Augoyard C, Bosch A, Lachaux A, Couchonnal E, Thaunat O, Boillot O, Dubois V. Pregnancy and donor-specific HLA-antibody-mediated rejection after liver transplantation: "Liaisons dangereuses"? *Transpl Immunol* 2019; 54:47-51.
72. Nguyen LS, Coutance G, Salem JE, Ouldamar S, Lebreton G, Combes A, Amour J, Laali M, Leprince P, Varnous S. Effect of recipient gender and donor-specific antibodies on antibody-mediated rejection after heart transplantation. *Am J Transplant* 2019; 19(4):1160-1167.
73. Higgins R, Lowe D, Daga S, Hathaway M, Williams C, Lam FT, Kashi H, Tan LC, Imray C, Fletcher S, Krishnan N, Hart P, Zehnder D, Briggs D. Pregnancy-induced HLA antibodies respond more vigorously after renal transplantation than antibodies induced by prior transplantation. *Hum Immunol* 2015; 76(8):546-52.
74. Lai Q, Giovanardi F, Melandro F, Larghi Laureiro Z, Merli M, Lattanzi B, Hassan R, Rossi M, Mennini G. Donor-to-recipient gender match in liver transplantation: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2018; 24(20):2203-2210.
75. Pan ET, Yoeli D, Galvan NTN, Kueht ML, Cotton RT, O'Mahony CA, Goss JA, Rana A. Cold ischemia time is an important risk factor for post-liver transplant prolonged length of stay. *Liver Transpl* 2018; 24(6):762-768.
76. Mathur AK, Heimbach J, Steffick DE, Sonnenday CJ, Goodrich NP, Merion RM. Donation after cardiac death liver transplantation: predictors of outcome. *Am J Transplant* 2010; 10(11):2512-9.
77. Jochmans I, Fieuws S, Tieken I, Samuel U, Pirenne J. The Impact of Implantation Time During Liver Transplantation on Outcome: A Eurotransplant Cohort Study. *Transplant Direct* 2018; 4(6):e356.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sinem Ünlü, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema *„Der Stellenwert Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper für das Patientenüberleben und den klinischen Verlauf nach orthotoper Lebertransplantation“* (engl. *The role of donor-specific anti HLA-antibodies in patient survival and clinical outcome after orthotopic liver transplantation*) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandene Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Bei der folgenden Publikation handelt es sich um eine alleinige Erstautorenschaft:

Sinem Ünlü, Nils Lachmann, Maximilian Jara, Paul Viktor Ritschl, Leke Wiering, Dennis Eurich, Christian Denecke, Matthias Biebl, Sascha Chopra, Safak Gül-Klein, Wenzel Schöning, Moritz Schmelzle, Petra Reinke, Frank Tacke, Johann Pratschke, Robert Öllinger, Tomasz Dziodzio.
Treatment of Anti-HLA Donor-Specific Antibodies Results in Increased Infectious Complications and Impairs Survival after Liver Transplantation.
J Clin Med 2020; 9(12).

Sie wird und wurde zum Zwecke der Dissertation ausschließlich von mir und keiner anderen Person verwendet.

Nach einer kurzen Einführung in die Thematik durch Herrn Professor Öllinger und Herrn Dr. med. Dziodzio erarbeitete ich das Studiendesign und die Endpunkte der Arbeit. Ich verfasste den Ethikantrag.

Daraufhin wurde der Kontakt zwischen mir und Herrn Dr. Lachmann aus dem Institut für Gewebetypisierung / HLA-Labor hergestellt. Herr Dr. Lachmann stellte mir eine Liste der im HLA-Labor untersuchten Lebertransplantat-Empfänger unseres Studienzeitraums zur Verfügung. Ich führte auf dieser Grundlage den Abgleich der Spender-Typisierung mit den detektierten anti-HLA-Antikörpern für alle 510 eingeschlossenen Patienten durch. Dabei dokumentierte ich das Vorhandensein, die Spezifität und die Anzahl der DSA, und führte die Einteilung in *präformiert* und *de novo* anhand des Transplantationsdatums durch. Im weiteren Verlauf kontrollierte ich im HLA-Labor alle Patienten dieser Liste, die einen positiven DSA-Befund aufwiesen, in der *HLA Fusion* Software. Dabei erfasste ich die MFI-Werte.

Ich erstellte und führte eine anonymisierte Datentabelle mit den klinischen Parametern aller Studienpatienten. Erhobene Befunde interpretierte ich selbstständig.

Die Aufbereitung der Daten für die statistische Auswertung in *SPSS* erfolgte durch mich, wie z.B. die Variablen-Kennzeichnung oder die Kategorisierung von Einzelbefunden. Dr. Dziodzio führte das 1:1 Propensity-Score Matching der DSA+ und DSA- Empfänger durch.

Die statistische Auswertung der in den Tabellen 1, 2, 4 und 5 der o.g. Publikation dargestellten Daten erfolgte durch mich.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse führte ich die Aufbereitung der Daten und Erstellung von Grafiken in *GraphPad Prism* durch und erstellte die Abbildung 2.

Der Publikationstext stammt von mir und wurde im Verlauf von Prof. Öllinger und Dr. Dziodzio supervidiert. Die Literaturrecherche erfolgte durch mich. Nach Weiterleitung des Manuskripts an die Ko-Autoren baute ich Kommentare und Verbesserungsvorschläge nach eigenem Ermessen ein. Der Coverletter wurde von mir verfasst und von Dr. Dziodzio angepasst. Dr. Dziodzio reichte das Manuskript am 03. November 2020 zur Veröffentlichung in der Zeitschrift *Journal of Clinical Medicine* ein.

Wir registrierten die Studie im Februar 2020 auf ISRCTN.com. Die erforderlichen Inhalte wurden von mir verfasst und von Dr. Dziodzio hochgeladen.

Unter Supervision durch Prof. Öllinger und Dr. Dziodzio setzte ich eigenständig die vom Journal gewünschten Revisionen um. Die Publikation wurde am 07. Dezember 2020 akzeptiert und am 09. Dezember 2020 online als Open Access-Publikation veröffentlicht. Die Übernahme der Publikationsgebühren durch den Open-Access-Publikationsfonds der Charité-Universitätsmedizin Berlin wurde durch Dr. Dziodzio erfolgreich beantragt.

Kongressteilnahme

Wir entschlossen uns, Zwischenergebnisse unserer Studie auf der Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG) 2018 in Berlin vorzustellen. Ich erstellte daraufhin die Powerpoint-Präsentation. Prof. Öllinger und Dr. Dziodzio hielten dabei bezüglich der Auswahl und Anordnung der zu präsentierenden Daten Rücksprache mit mir. Ihre Verbesserungsvorschläge setzte ich um und präsentierte die Daten eigenständig auf dem Kongress im Rahmen eines 10-minütigen Vortrags.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers Prof. Dr. Robert Öllinger

Unterschrift, Datum / Sinem Ünlü

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“MEDICINE, GENERAL and INTERNAL”**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 165 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE	347,451	74.699	0.660800
2	LANCET	256,199	60.392	0.437300
3	JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION	158,632	45.540	0.290050
4	Nature Reviews Disease Primers	7,567	40.689	0.032310
5	BMJ-British Medical Journal	118,586	30.223	0.145170
6	ANNALS OF INTERNAL MEDICINE	58,033	21.317	0.091210
7	JAMA Internal Medicine	17,260	18.652	0.086180
8	PLOS MEDICINE	32,312	10.500	0.065990
9	Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle	3,553	9.802	0.007860
10	Cochrane Database of Systematic Reviews	67,763	7.890	0.134360
11	CANADIAN MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL	15,212	7.744	0.016160
12	JOURNAL OF TRAVEL MEDICINE	2,659	7.089	0.006360
13	MAYO CLINIC PROCEEDINGS	15,627	6.942	0.024990
14	JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE	10,912	6.871	0.014180
15	BMC Medicine	15,204	6.782	0.042500
16	MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA	11,075	6.112	0.011070
17	Translational Research	4,043	5.411	0.008350
18	JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE	4,214	5.238	0.002580
19	JAMA Network Open	2,239	5.032	0.007660

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
20	Deutsches Arzteblatt International	4,817	4.796	0.007380
21	ANNALS OF FAMILY MEDICINE	5,567	4.686	0.010880
22	JOURNAL OF GENERAL INTERNAL MEDICINE	20,229	4.597	0.026960
23	AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE	24,975	4.529	0.024230
24	Journal of Personalized Medicine	617	4.433	0.001950
25	AMERICAN JOURNAL OF PREVENTIVE MEDICINE	23,547	4.420	0.040180
26	European Journal of Internal Medicine	4,933	4.329	0.010280
27	AMYLOID-JOURNAL OF PROTEIN FOLDING DISORDERS	1,486	4.323	0.002920
28	BRITISH JOURNAL OF GENERAL PRACTICE	6,669	4.190	0.008670
29	Frontiers in Medicine	3,034	3.900	0.009870
30	PREVENTIVE MEDICINE	17,316	3.788	0.030080
31	PALLIATIVE MEDICINE	5,413	3.739	0.008460
32	AMERICAN JOURNAL OF CHINESE MEDICINE	3,531	3.682	0.002970
33	MEDICAL CLINICS OF NORTH AMERICA	3,161	3.529	0.004080
34	EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION	6,344	3.481	0.006590
35	PANMINERVA MEDICA	806	3.467	0.000660
36	Journal of Clinical Medicine	5,214	3.303	0.010940
37	ANNALS OF MEDICINE	4,510	3.243	0.005190
38	CANADIAN FAMILY PHYSICIAN	3,833	3.112	0.005150

Article

Treatment of Anti-HLA Donor-Specific Antibodies Results in Increased Infectious Complications and Impairs Survival after Liver Transplantation

Sinem Ünlü ^{1,2}, Nils Lachmann ², Maximilian Jara ¹, Paul Viktor Ritschl ^{1,3}, Leke Wiering ¹, Dennis Eurich ¹, Christian Denecke ¹, Matthias Biebl ¹, Sascha Chopra ¹, Safak Gül-Klein ¹, Wenzel Schönig ¹, Moritz Schmelzle ¹, Petra Reinke ⁴, Frank Tacke ⁵, Johann Pratschke ¹, Robert Öllinger ¹ and Tomasz Dziodzio ^{1,*}

¹ Department of Surgery, Campus Charité Mitte and Campus Virchow-Klinikum, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; sinem.uenlue@charite.de (S.Ü.); maximilian.jara@charite.de (M.J.); paul.ritschl@charite.de (P.V.R.); leke.wiering@charite.de (L.W.); dennis.eurich@charite.de (D.E.); christian.denecke@charite.de (C.D.); matthias.biebl@charite.de (M.B.); sascha.chopra@charite.de (S.C.); safak.klein@charite.de (S.G.-K.); wenzel.schoening@charite.de (W.S.); moritz.schmelzle@charite.de (M.S.); johann.pratschke@charite.de (J.P.); robert.oellinger@charite.de (R.Ö.)

² Institute for Transfusion Medicine, H&I Laboratory, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; nils.lachmann@charite.de

³ BIH Charité Clinician Scientist Program, Berlin Institute of Health (BIH), 10178 Berlin, Germany

⁴ Department of Nephrology and Internal Intensive Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; petra.reinke@charite.de

⁵ Department of Hepatology and Gastroenterology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; frank.tacke@charite.de

* Correspondence: tomasz.dziodzio@charite.de; Tel.: +48-(030)-450552001

Received: 3 November 2020; Accepted: 7 December 2020; Published: 9 December 2020



Abstract: Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies (DSA) are controversially discussed in the context of liver transplantation (LT). We investigated the relationship between the presence of DSA and the outcome after LT. All the LTs performed at our center between 1 January 2008 and 31 December 2015 were examined. Recipients < 18 years, living donor-, combined, high-urgency-, and re-transplantations were excluded. Out of 510 LTs, 113 DSA-positive cases were propensity score-matched with DSA-negative cases based on the components of the Balance of Risk score. One-, three-, and five-year survival after LT were 74.3% in DSA-positive vs. 84.8% ($p = 0.053$) in DSA-negative recipients, 71.8% vs. 71.5% ($p = 0.821$), and 69.3% vs. 64.9% ($p = 0.818$), respectively. Rejection therapy was more often applied to DSA-positive recipients ($n = 77$ (68.1%) vs. 37 (32.7%) in the control group, $p < 0.001$). At one year after LT, 9.7% of DSA-positive patients died due to sepsis compared to 1.8% in the DSA-negative group ($p = 0.046$). The remaining causes of death were comparable in both groups (cardiovascular 6.2% vs. 8.0%; $p = 0.692$; hepatic 3.5% vs. 2.7%, $p = 0.788$; malignancy 3.5% vs. 2.7%, $p = 0.788$). DSA seem to have an indirect effect on the outcome of adult LTs, impacting decision-making in post-transplant immunosuppression and rejection therapies and ultimately increasing mortality due to infectious complications.

Keywords: DSA; survival analysis; sepsis; rejection treatment

1. Introduction

The clinical relevance of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies (DSA) in liver transplantation (LT) has been the basis for many controversial discussions. In kidney transplantation,

the negative effects of preformed and de novo DSA on patient and graft survival have been well demonstrated [1,2]. Furthermore, the presence of DSA in other solid organ transplantations, such as of the lung [3], heart [4], or pancreas [5], has been reported to be associated with inferior graft outcomes. For many years, liver grafts have been considered less vulnerable to DSA due to the graft size, dual blood supply, and the patient’s own immunological activity [6]. Since the first observations of antibody-mediated rejections (ABMR) in LT 30 years ago [7], especially recent data have led to a new perception of DSA in the context of LT. In 2016, the Banff Working Group provided a first approach on standardized (histopathological) ABMR criteria [8] and new laboratory techniques, such as the Luminex® assay, helping to achieve a more precise antibody detection, specification, and quantification [9,10]. Additionally, pathologic conditions such as T-cell-mediated rejections (TCMR) and infections can lead to an upregulation of tissue human leukocyte antigen (HLA) expression and make the liver graft more susceptible to ABMR [6,11,12].

Recent findings indicate an association between DSA and early/chronic rejections and graft injury [13–18] However, the data regarding the impact of DSA on patient and graft survival after LT are less clear [13–16,18–23].

Consequently, there is still a need for data to clarify the effects of DSA’s presence on LT outcomes. The aim of this study was to investigate the impact of DSA on patient and graft survival by means of a matched case-control analysis and to identify risk factors for inferior patient and graft outcomes.

2. Patients and Methods

2.1. Patient Recruitment and Study Design

Since January 2008, DSA were prospectively assessed by the Luminex® assay in all patients waitlisted for LT and post-LT. All patients undergoing deceased organ donor LT at the Department of Surgery, Campus Charité Mitte and Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Germany, from 1 January 2008 to 31 December 2015, were examined, with follow-up ceasing on 1 January 2018. Combined liver-kidney, multi-visceral, high-urgency [24], and re-transplantations or patients who were under the age of 18 years at the time of LT were excluded from the analysis (Figure 1).

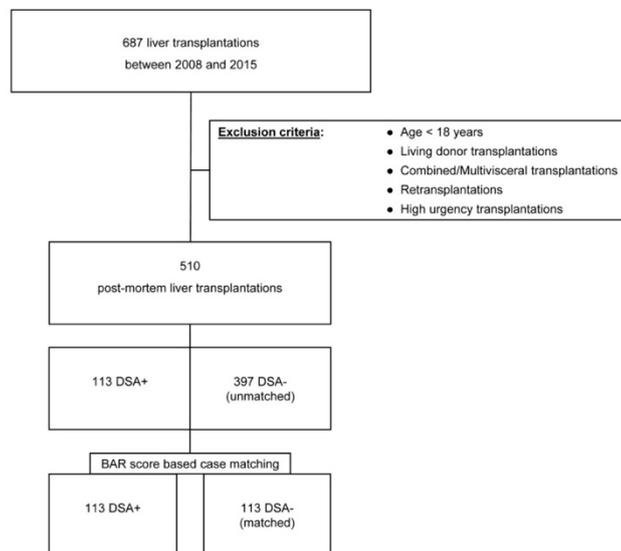


Figure 1. Visualization of the patient selection and matching process.

The study cohort was divided into two groups (DSA-positive and DSA-negative patients) and compared regarding their demographic variables and transplant outcomes. A 1:1 propensity score matching of DSA-positive and DSA-negative individuals based on the components of the BAR (Balance of Risk) score was performed and the groups were compared. The primary endpoints were patient and graft survival regarding the presence of DSA. Secondary endpoints were the appearance of any rejection and cause of death. The study was approved by the institutional ethics committee (ID: EA4/061/17).

2.2. Data Collection and Definition of Patient and Graft Survival

Electronic records of recipient information were obtained from a prospectively collected hospital database (SAP® SE, Walldorf, Germany). Anonymous donor data were acquired from the Eurotransplant Network Information System (ENIS).

Cold ischemia time (CIT), warm ischemia time (WIT), patient survival, and graft survival were defined according to the United Network for Organ Sharing (UNOS) criteria [25,26].

2.3. Antibody Screening

The detection and specification of anti-HLA antibodies were performed using LABScreen® Mixed and Single Antigen Beads (OneLambda, West Hills, CA, USA), respectively, according to the authors' previously published work [9]. Samples were measured on a Luminex® 200 (Luminex®, Austin, TX, USA) and analyzed using the HLA Fusion software (OneLambda). Donor-HLA-typing for HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 was acquired from ENIS and matched with the antibody specificities of the recipient to define the DSA. Organ recipients were routinely screened for DSA before LT listing and on the day of LT to detect preformed DSA. Postoperatively, de novo DSA screening was performed on a weekly basis until the discharge from the ICU and at the request of the treating surgeon. During routine check-ups, DSA detection was performed in patients with graft function impairment or for the follow-up of previously detected DSA. Preformed DSA were defined as antibodies present before or at the time of LT. De novo DSA were defined as newly detected antibodies after LT or antibodies against epitopes that were not present before LT in patients with preformed DSA. Data were normalized to negative control serum and all the DSA exceeding a mean fluorescence intensity (MFI) of 1000 were considered positive.

2.4. Postoperative Management

Liver function parameters were monitored daily during the entire perioperative stay and routinely examined after 3, 6, 12, 18, 24, 36, and 60 months. Postoperative care and immunosuppression (IS) regimens were provided according to a standardized protocol. In the case of LTs due to autoimmune liver disease (AILD), antibody induction with antithymocyte globulin (ATG) or IL-2 receptor antagonists was applied. The standard IS consisted of prednisolone and tacrolimus. No adaptation of IS has been made in the case of preformed DSA. In AILD recipients, the IS was extended by mycophenolic acid. Initial tacrolimus levels were set at 6–8 ng/mL in standard LTs and 8–10 ng/mL in LTs due to AILD and tapered within the first 6 months to maintenance levels of 4–6 ng/mL in all patients. Steroids were tapered off for most patients within 2 months after LT. Patients who underwent LT due to AILD were maintained on a double therapy with tacrolimus and mycophenolate.

2.5. Rejection Diagnosis and Treatment

Biopsies were performed in case of suspected rejection and routinely at 1, 3, and 5 years post LT. Histological diagnosis and the grading of allograft rejections was classified according to the Banff criteria of 2000 and later its update of 2016 [8,27]. Rejection therapy was initiated in the case of histologically proven rejection or in patients with a suspected rejection due to a significant increase in liver function parameters and after the exclusion of other causes. Initial rejection therapy consisted of steroids and increased doses of the standard IS. In ABMR, the initial immunosuppressive therapy was augmented by plasmapheresis (PP), intravenous immunoglobulins (IVIGs), and occasionally

rituximab. Refractory TCMR were treated with ATG. Cases receiving rejection treatment with equivocal histological findings or without a bioptical verification of rejection were retrospectively defined as ABMR or TCMR treated “on clinical suspicion” depending on the therapy received.

2.6. Survival Stratification Model and Outcome

The BAR score achieves the most accurate outcome stratification in terms of patient survival compared to all known scores and was used for the outcome stratification and matching process [28–30]. The BAR score and MELD were calculated according to the UNOS and Eurotransplant formulas [28,30] and the donor risk index (DRI) according to the published formula by Feng et al. [31].

2.7. Statistical Analyses

Statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics, version 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA), and GraphPad Prism, version 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Categorical data are presented as frequencies and percentages and were compared by Pearson’s chi-squared test. Continuous data are presented as median and interquartile range and compared by the non-parametric Mann–Whitney U test. The propensity score method with a logistic model was used to match cases and controls. The matching process included the following components of the BAR score: MELD score, donor age, recipient age, pretransplant mechanical, ventilated or organ-perfusion support, and CIT. Retransplantation was an exclusion criterion for the analysis and was not embedded in the matching process.

Patient and organ survival were analyzed by the Kaplan–Meier method and the log-rank test to compare groups. A two-sided *p*-value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Study Population

During the observation period, a total of 687 LTs were performed. The final analysis comprised 510 patients. Clinical data were available for all patients. DSA were identified in 113 LT recipients (22.2%). The remaining 397 patients (77.8%) were DSA-negative. Within the DSA-positive LT recipients, 49 (43.4%) individuals showed preformed, 55 (48.6%) de novo, and 9 (8%) individuals were tested positive for both preformed and de novo DSA. The median time to the first detection of de novo DSA was 13 days (9.5–20). Class II DSA were present in 50.9% (*n* = 28) of the patients with de novo and 10.2% of those with preformed DSA (*n* = 5, *p* < 0.001) (data listed in Supplementary Table S1).

The median follow-up was 58 (29–86) months. In the unmatched analysis, the median recipient age at LT was 54 (48–61) years in the DSA-positive group and 57 (51–62) years in the DSA-negative group (*p* = 0.073). The main indication of LT in both groups DSA-positive vs. DSA-negative was alcoholic cirrhosis (*n* = 34 (30.1%) vs. *n* = 188 (47.4%); *p* = 0.001), followed by hepatocellular carcinoma (*n* = 32 (28.3%), vs. *n* = 157 (39.5%), *p* = 0.029). The median BAR score at LT significantly differed between the DSA-positive and the DSA-negative group (8 (3–13) vs. 6 (3–9), *p* = 0.013). There was no significant difference in the MELD score between both groups (16 (9–22) in DSA-positive vs. 15 (10–20) in DSA-negative recipients, *p* = 0.377; Table 1). Out of all DSA-negative patients, 28% (*n* = 111) showed a female-to-male (F-M) donor-to-recipient mismatch. The DSA-positive group consisted of 17.7% (*n* = 20, *p* = 0.028) F-M mismatches.

Table 1. Epidemiological, clinical, and operative data of patients who underwent LT from deceased donors between 1 January 2008, and 31 December 2015, sorted by DSA-positive versus all DSA-negative recipients (unmatched).

Variables	DSA+ (n = 113)		All DSA- (n = 397)		p-Value ^a
General					
Recipient sex male, n (%)	58	(51.3)	286	(72.0)	<0.001
Recipient age (years)	54	(48–61)	57	(51–62)	0.073
Recipient BMI (kg/m ²)	26.7	(24–31)	26.6	(24–30)	0.623
Donor sex male, n (%)	62	(54.9)	214	(53.9)	0.856
Donor age (years)	59	(45–70)	57	(44–70)	0.576
BAR score	8	(3–13)	6	(3–9)	0.013
DRI	2.5	(2.1–2.8)	2.5	(2–2.8)	0.288
labMELD	16	(9–22)	15	(10–20)	0.377
labMELD ≥ 35, n (%)	20	(17.7)	37	(9.3)	0.645
Gender mismatch F-M, n (%)	20	(17.7)	111	(28)	0.028
Etiology, n (%)					
Hepatitis C	20	(17.7)	77	(19.4)	0.685
Alcohol	34	(30.1)	188	(47.4)	0.001
PSC/PBC/AIH	13	(11.5)	33	(8.3)	0.296
NASH/cryptogenic cirrhosis	22	(19.5)	39	(9.8)	0.005
Metabolic/congenital	9	(8)	13	(3.3)	0.030
Other	17	(15)	54	(13.6)	0.696
Malignancy	37	(32.7)	161	(40.6)	0.133
Hepatocellular carcinoma	32	(28.3)	157	(39.5)	0.029
Cholangiocellular carcinoma	5	(4.4)	4	(1.0)	0.015
Perioperative Characteristics					
Time on waiting list (days)	155	(27–407)	109	(33–259)	0.158
Cold ischemia time (h)	9.7	(8–11)	9.6	(8–11)	0.760
Warm ischemia time (min)	43	(38–50)	45	(40–55)	0.082
Length of stay after LT (days)	38	(28–62)	29	(21–47)	0.001
Length of stay on ICU (days)	13	(7–32)	9	(6–15)	<0.001
Retransplantations, n (%)	6	(5.3)	34	(8.6)	0.268

Annotations: Data presented as n (%) or median and interquartile range (Q1–Q3). ^a Group comparisons: (1) categorical data: Pearson chi-square test. (2) Continuous variables: Mann-Whitney U test. Abbreviations: AIH: Autoimmune hepatitis; BAR: Balance of Risk Score; BMI: Body Mass Index; d: days; DRI: Donor Risk Index; DSA: Donor-Specific Antibodies; FFP: Fresh Frozen Plasma; Gender mismatch F-M: female donor-to-male recipient mismatch; h: hours; ICU: Intensive Care Unit; labMELD: laboratory Model of End-stage Liver Disease Score; LT: Liver Transplantation; min: minutes; NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis; PBC: Primary Biliary Cholangitis; PSC: Primary Sclerosing Cholangitis; RBC: Red Blood Cells.

BAR Score Group Matching

Out of the 397 DSA-negative individuals, 113 patients were matched 1:1 with 113 DSA-positive individuals (Table 2). Median follow-up was 59 (25–101) months.

In both groups, the main indication for LT remained alcoholic cirrhosis (DSA-positive: n = 34 (30.1%) vs. 56 (49.6%) DSA-negative, p = 0.003) and hepatocellular carcinoma (DSA-positive n = 32 (28.3%) vs. 45 (39.8%) DSA-negative, p = 0.068). Organ recipients with PSC/PBC/AIH and NASH as underlying disease were more frequently represented in the DSA-positive group. No significant differences were observed between the DSA-positive and DSA-negative group regarding the BAR score (8 (3–13) vs. 7 (4–13), p = 0.619) and the distribution of its single components (MELD at LT: 16 (9–22) vs. 16 (10–29), p = 0.426; necessity of pretransplant mechanical, ventilated or organ-perfusion support: n = 6 (5.4%) vs. 4 (3.6%), p = 0.322; recipient age: 54 (48–61) vs. 57 (51–62) years, p = 0.061; and donor age: 56 (44–69) vs. 59 (45–70) years, p = 0.301). The number of high labMELD (> 35) patients was comparable in both groups (n = 20 (17.7%) vs. 16 (14.2%), p = 0.686).

Table 2. Epidemiological, clinical, and operative data of patients who underwent LT from deceased donors between 1 January 2008 and 31 December 2015 sorted by DSA-positive (DSA+) versus matched DSA-negative recipients (matched DSA-).

Variables	DSA+ (n = 113)		Matched DSA- (n = 113)		p-Value ^a
General					
Recipient sex male, n (%)	58	(51.3)	80	(70.8)	0.003
Recipient age (years)	54	(48–61)	57	(51–62)	0.061
Recipient BMI (kg/m ²)	26.7	(24–31)	26.3	(23–30)	0.271
Recipient hypertension, n (%)	40	(35.4)	34	(30.1)	0.395
Recipient diabetes type II, n (%)	37	(32.7)	35	(31)	0.775
Donor sex male, n (%)	62	(54.9)	60	(53.1)	0.790
Donor age (years)	59	(45–70)	56	(44–69)	0.301
BAR score	8	(3–13)	7	(4–13)	0.619
DRI	2.5	(2.1–2.8)	2.4	(2–2.8)	0.532
labMELD	16	(9–22)	16	(10–29)	0.426
labMELD >35, n (%)	20	(17.7)	16	(14.2)	0.686
Gender mismatch F-M, n (%)	20	(17.7)	30	(26.5)	0.109
MFImax	4332	(1470–7336)	-	-	-
Etiology, n (%)					
Hepatitis C	20	(17.7)	20	(17.7)	1.000
Alcohol	34	(30.1)	56	(49.6)	0.003
PSC/PBC/AIH	13	(11.5)	9	(7.9)	0.369
NASH/cryptogenic cirrhosis	22	(19.5)	11	(9.7)	0.058
Metabolic/congenital	9	(7.9)	5	(4.4)	0.270
Other	17	(15)	11	(9.7)	0.226
Malignancy	37	(32.7)	47	(41.6)	0.169
Hepatocellular carcinoma,	32	(28.3)	45	(39.8)	0.068
Cholangiocellular carcinoma	5	(4.4)	2	(2.7)	0.249
Perioperative Characteristics					
Time on waiting list (days)	155	(27–407)	101	(30–226)	0.052
Pretransplant mechanical, ventilated or organ-perfusion support, n (%)	6	(5.4)	4	(3.6)	0.322
Cold ischemia time (h)	9.7	(8–11)	10.2	(9–12)	0.021
Warm ischemia time (min)	43	(38–50)	48	(40–56)	0.012
RBCs given during LT (units)	8	(4–12)	6	(4–13)	0.301
RBCs given within 24 h after LT (units)	2	(0–4)	2	(0–4)	0.985
FFPs given during LT (units)	21	(16–32)	21	(16–30)	0.697
FFPs given within 24 h after LT (units)	5	(2–8)	4	(2–9)	0.369
Length of stay after LT (days)	38	(28–62)	32	(23–49)	0.012
Length of stay on ICU (days)	13	(7–32)	9	(6–15)	0.008
Retransplantations, n (%)	6	(5.3)	11	(9.7)	0.207
One-year Mortality, n (%)					
Hepatic	4	(3.5)	3	(2.7)	0.788
Cardiovascular	7	(6.2)	9	(8.0)	0.692
Infection/Sepsis	11	(9.7)	2	(1.8)	0.046
Malignancy	4	(3.5)	3	(2.7)	0.788
Other/Unknown	3	(2.7)	1	(0.9)	0.567

Annotations: Data presented as n (%) or median and interquartile range (Q1–Q3). ^a Group comparisons: (1) categorical data: Pearson chi-square test. (2) Continuous variables: Mann-Whitney U test. Abbreviations: AIH: Autoimmune hepatitis; BAR: Balance of Risk Score; BMI: Body Mass Index; d: days; DRI: Donor-Risk-Index; DSA: Donor-Specific Antibodies; FFP: Fresh Frozen Plasma; Gender mismatch F-M: female donor-to-male recipient mismatch; ICU: Intensive Care Unit; h: hours; labMELD: laboratory Model of End-stage Liver Disease Score; LT: Liver Transplantation; min: minutes; MFImax: Median Fluorescence Intensity of the highest-ranked positive bead in the bead panel; NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis; PBC: Primary Biliary Cholangitis; PSC: Primary Sclerosing Cholangitis; RBC: Red Blood Cells.

DSA-positive recipients showed a shorter CIT and WIT compared to the DSA-negative recipients (CIT: 9.7 (8–11) vs. 10.2 (9–12) hours, $p = 0.021$, and WIT: 43 (38–50) vs. 48 (40–56) minutes; $p = 0.012$).

No differences in the overall courses of liver function parameters were observed between the groups, apart from only three particular lab tests being statistically significant at distinct points in time (Gamma-glutamyl transferase: on POD 7: DSA-group 245 (134–435) vs. 206 (118–308) in the control group, $p = 0.047$; Albumin on POD 7: 2.9 (2.7–3.1) vs. 3.0 (2.8–3.3), $p = 0.010$; and alkaline phosphatase 12 months after LT: 106 (81–202) vs. 97 (75–129), $p = 0.043$; Figure 2).

The median length of stay (38 (28–62) vs. 32 (23–49) days; $p = 0.012$) and median time spent on ICU after LT (13 (7–32) vs. 9 (6–15) days; $p = 0.008$) were both significantly longer in the DSA-positive patients. No significant difference was observed with regard to the F-M donor-to-recipient mismatch between the groups (DSA-positive group $n = 20$ (17.7%) vs. $n = 30$ (26.6%) in the DSA-negative group, $p = 0.109$).

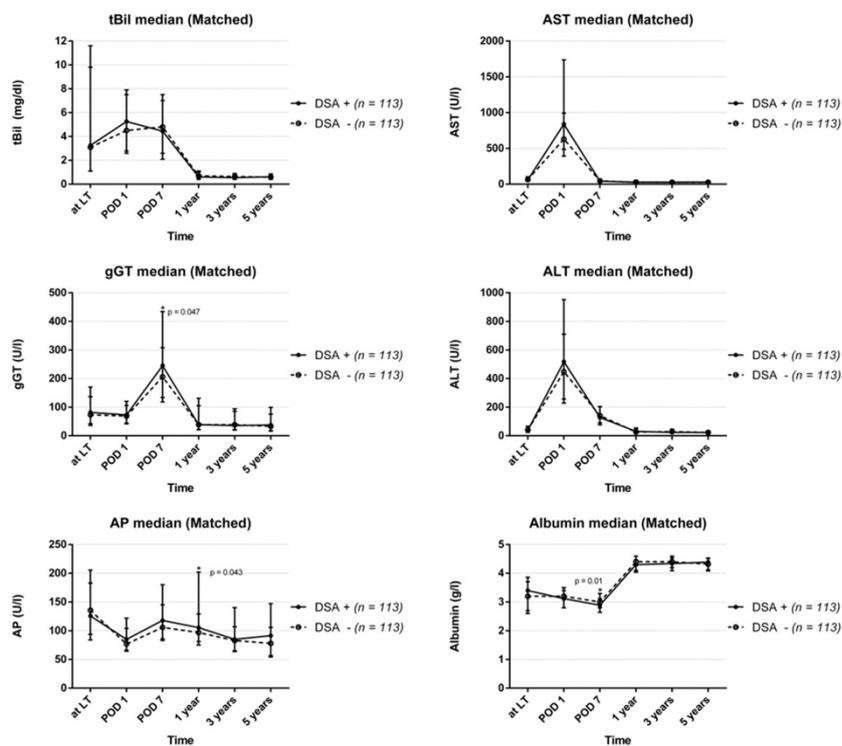


Figure 2. Course of routine laboratory parameters after liver transplantation divided into DSA-positive and DSA-negative recipients (total bilirubin: tBil; alanine aminotransferase: ALT; serum aspartate aminotransferase: AST; gamma-glutamyl transferase: gGT; albumin: ALB; alkaline phosphatase: AP).

3.2. Patient and Graft Survival

3.2.1. DSA-Positive vs. All DSA-Negative LT Recipients

The overall patient and graft survival is shown in Figure 3a. In the unmatched analysis at one year, the patient survival after LT was significantly lower in DSA-positive compared to DSA-negative allograft recipients (74.4% vs. 86.3%; $p = 0.003$). No significant differences in patient survival were observed at three (71.8% vs. 76.9%; $p = 0.156$) and five years after LT (69.3% vs. 71.8%; $p = 0.400$). The graft survival

of DSA-positive individuals was inferior at one year after LT compared to DSA-negative individuals (73.4% vs. 80.2%; $p = 0.167$), with no significant difference at three (68.9% vs. 70.8%; $p = 0.636$) and five years (66.6% vs. 64.7%; $p = 0.636$) after LT.

3.2.2. DSA-Positive vs. Matched DSA-Negative LT Recipients

In the matched analysis, the one-year patient survival after LT was 74.4% in the DSA-positive vs. 84.8% ($p = 0.053$) in the DSA-negative cohort, 71.8% vs. 71.2% ($p = 0.821$) at three years and 66.6% vs. 64.9% ($p = 0.818$) at five years, respectively. Infections and sepsis were the major causes of death in the DSA-positive allograft recipients and significantly more frequent than in the matched DSA-negative cohort ($n = 11$ (9.7%) vs. $n = 2$ (1.8%); $p = 0.046$). Hospital-acquired pneumonia was the main cause of sepsis ($n = 7$ in DSA-positive; and $n = 2$ in DSA-negative patients). All the infection-related deaths occurred within the first 6 months after LT. The distribution of the remaining causes of death was comparable in both groups (cardiovascular 6.2% vs. 8.0%; $p = 0.692$; hepatic 3.5% vs. 2.7%, $p = 0.788$; malignancy 3.5% vs. 2.7%, $p = 0.788$). DSA-positive individuals showed an inferior one-year graft survival compared to the matched DSA-negative ones (73.4% vs. 79.5%; $p = 0.270$), with a non-significant reciprocal trend at five years (66.5% vs. 57.7%; $p = 0.339$). Retransplantations were necessary in 6 (5.3%) DSA-positive and 11 (9.7%) DSA-negative LT recipients ($p = 0.207$).

Significantly more patients were female (48.7%) in the DSA-positive group than in the matched DSA-negative control (29.2%, $p = 0.003$). The proportion was higher in LT recipients with preformed DSA (65.3% women).

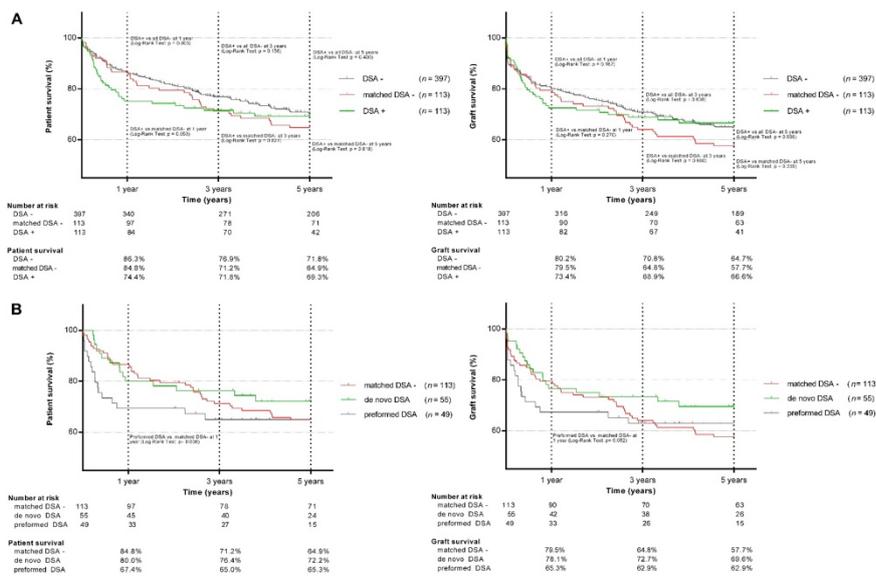


Figure 3. Patient and graft survival in DSA-positive, DSA-negative, matched DSA-negative (A), and preformed and de novo DSA (B) liver transplant recipients.

3.2.3. DSA Subgroup Analysis

Recipients with preformed DSA showed an inferior one-year patient (67.4% vs. 84.8%; $p = 0.008$) and graft survival (65.3% vs. 79.5%; $p = 0.062$) compared to the matched DSA-negative individuals, with sepsis as the leading cause of death (preformed DSA: $n = 7$ (6.2%) vs. $n = 2$ (1.8%); $p = 0.031$; Table 3). The lower survival rate in the first year was even more pronounced in patients with preformed DSA and a MFImax of ≥ 5000 ($n = 19$, 63.2% vs. 84.8%, $p = 0.022$). No significant differences in mortality

or graft loss were observed between individuals with de novo and matched DSA-negative individuals at any time point (Figure 3b), regardless of the MFI level.

Table 3. Reasons for one-year graft loss and mortality in preformed DSA, de novo DSA, and matched DSA-negative (matched DSA-) LT organ recipients ^a.

	Preformed DSA (n = 49)		De Novo DSA (n = 55)		p-Value		Matched DSA- (n = 113)		p-Value ^b		p-Value ^c	
Total graft loss and death	16	(14.2)	11	(9.7)		18	(15.9)					
Hepatic	2	(1.8)	1	(0.9)	1.782	3	(2.7)		0.732		0.566	
Cardiovascular	5	(4.4)	2	(1.8)	0.446	9	(8.0)		0.268		0.087	
Infection/Sepsis	7	(6.2)	3	(2.7)	0.384	2	(1.8)		0.031		0.264	
Malignancy	1	(0.9)	3	(2.7)	0.131	3	(2.7)		0.347		0.494	
Other/Unknown	1	(0.9)	2	(1.8)	0.332	1	(0.9)		0.933		0.279	

Annotations: Data presented as n (%). ^a Two deaths observed in patients with both preformed and de novo DSA are not shown (1 hepatic, 1 infectious). ^b Comparison with organ recipients with preformed DSA only. ^c Comparison with organ recipients with de novo DSA only. Abbreviations: DSA: Donor-Specific Antibodies; IVIG: Intravenous Immunoglobulins; LT: Liver Transplantation

3.3. Rejections and Rejection Treatment

Within the first year after LT, biopsies were performed in 72 DSA-positive (63.7%) and 127 DSA-negative patients (32.0%, $p < 0.001$). Rejection therapies were more frequently conducted in the DSA-positive ($n = 77, 68.1%$) than in the DSA-negative group ($n = 135, 34.0%$, $p < 0.001$; Table 4). In the matched cohorts, ABMR were histologically confirmed in 2 (1.8%) DSA-positive cases and no DSA-negative cases ($p = 0.155$). ABMR treatment was applied in 41 (36.3%) DSA-positive and in 2 (1.8%, $p < 0.001$) DSA-negative LT recipients. TCMR were histologically confirmed in 59 (52.2%) DSA-positive and 34 (30.1%, $p < 0.001$) DSA-negative recipients. In total, 71 (62.8%) DSA-positive and 37 (32.7%, $p < 0.001$) DSA-negative individuals received TCMR therapy. The most common rejection therapy was a combination of steroids and increase in the standard IS dose (DSA-positive group: $n = 70 (61.9%)$ vs. $37 (32.7%)$ DSA-negative group, $p < 0.001$). The overall number of treated ABMR and TCMR was comparable in the LT recipients with preformed and de novo DSA (Table 5). Patients with de novo DSA were more often treated for biopsy-proven TCMR ($n = 35, 63.6%$) than patients with preformed DSA ($n = 19, 38.8%$, $p = 0.011$) and without DSA ($n = 34, 30.1%$, $p < 0.001$). Six DSA-positive (5.3%) and 3 DSA-negative patients (2.7%, $p = 0.307$) were treated for TCMR on clinical suspicion without histological verification. In two (1.8%) of these DSA-positive patients, rejection therapy was additionally augmented by PP/IVIG due to suspected refractory rejection and the presence of preformed DSA. In one DSA-positive patient (0.9%) with preformed DSA, PP/IVIG therapy was applied without biopsy.

Patients with preformed DSA received the first rejection therapy significantly earlier compared to patients with de novo DSA (6 (5–16) vs. 11.5 (7–18) days; $p = 0.024$) and DSA-negative patients (9 (7–23) days, $p = 0.003$).

Table 4. Comparison of rejections and rejection treatments in LT organ recipients within the first postoperative year sorted by DSA-positive (DSA+) versus DSA-negative (DSA-) and matched DSA-negative (matched DSA-) recipients.

	DSA+ (n = 113)		All DSA- (n = 397)		p-Value ^a	Matched DSA- (n = 113)		p-Value ^a
Cases with performed biopsies	72	(63.7)	127	(32.0)	<0.001	35	(31.0)	<0.001
Treated ABMR	41	(36.3)	7	(1.8)	<0.001	2	(1.8)	<0.001
Biopsy proven	2	(1.8)	0	(0.0)	0.008	0	(0.0)	0.155
On clinical suspicion	39	(34.5)	7	(1.8)	<0.001	2	(1.8)	<0.001
Treated TCMR	71	(62.8)	135	(34.0)	<0.001	37	(32.7)	<0.001
Biopsy proven	59	(52.2)	118	(29.7)	<0.001	34	(30.1)	<0.001
On clinical suspicion	12	(10.6)	17	(4.3)	0.010	3	(2.7)	<0.001
Rejection therapy	77	(68.1)	135	(34.0)	<0.001	37	(32.7)	<0.001
Steroids ^b	70	(61.9)	133	(33.5)	<0.001	37	(32.7)	<0.001
Plasmapheresis/IVIGs	41	(36.3)	7	(1.8)	<0.001	2	(1.8)	<0.001
Thymoglobulin	29	(25.7)	17	(4.3)	<0.001	3	(2.7)	<0.001
Rituximab	1	(0.8)	0	(0.0)	0.061	0	(0.0)	0.316
Other	16	(14.2)	41	(10.3)	0.254	13	(11.5)	0.551
Time from LT to therapy (days)	9.5	(6–17)	9	(7–23)	0.159	9	(7–23)	0.214

Annotations: Data presented as n (%) or median and interquartile range (Q1–Q3). Group comparisons: (1) categorical data: Pearson chi-square test. (2) Continuous variables: Mann-Whitney U test. ^a Comparison with DSA+ organ recipients. ^b Combined with an increase in standard immunosuppression. Abbreviations: ABMR: Antibody-mediated rejection; DSA: Donor-Specific Antibodies; IVIG: Intravenous Immunoglobulins; LT: Liver Transplantation; TCMR: T-cell-mediated rejection.

Table 5. Comparison of rejections and rejection treatments in LT organ recipients within the first postoperative year sorted by patients with de novo DSA versus preformed DSA and matched DSA-negative (matched DSA) recipients.

	Preformed DSA (n = 49)		De Novo DSA (n = 55)		p-Value	Matched DSA- (n = 113)		p-Value ^a	p-Value ^b
Cases with performed biopsies	25	(51.0)	39	(70.9)	0.037	35	(31.0)	0.015	<0.001
Treated ABMR	16	(32.7)	20	(36.4)	0.691	2	(1.8)	<0.001	<0.001
Biopsy proven	1	(2.0)	1	(1.8)	0.934	0	(0.0)	0.128	0.151
On clinical suspicion	15	(30.6)	19	(34.5)	0.670	2	(1.8)	<0.001	<0.001
Treated TCMR	26	(53.1)	38	(69.1)	0.093	37	(32.7)	0.015	<0.001
Biopsy proven	19	(38.8)	35	(63.6)	0.011	34	(30.1)	0.279	<0.001
On clinical suspicion	7	(14.3)	3	(5.5)	0.127	3	(2.7)	0.005	0.359
Rejection therapy	29	(59.2)	39	(70.9)	0.210	37	(32.7)	0.002	<0.001
Steroids ^b	25	(51.0)	38	(69.1)	0.060	37	(32.7)	0.028	<0.001
Plasmapheresis/IVIGs	16	(32.7)	20	(36.4)	0.691	2	(1.8)	<0.001	<0.001
Thymoglobulin	9	(18.4)	18	(32.7)	0.095	3	(2.7)	<0.001	<0.001
Rituximab	1	(2.0)	0	(0.0)	0.287	0	(0.0)	0.128	
Other	5	(10.2)	9	(16.4)	0.358	13	(11.5)	0.809	0.381
Time from LT to therapy (days)	6	(5–16)	11.5	(7–18)	0.024	9	(7–23)	0.003	0.693

Annotations: Data presented as n (%) or median and interquartile range (Q1–Q3). Group comparisons: (1) categorical data: Pearson chi-square test. (2) Continuous variables: Mann-Whitney U test. Patients with both preformed and de novo DSA are not shown (n = 9). ^a Comparison with organ recipients with preformed DSA. ^b Comparison with organ recipients with de novo DSA. ^c Combined with an increase in standard immunosuppression. Abbreviations: ABMR: Antibody-mediated rejection; DSA: Donor-Specific anti-HLA Antibodies; IVIG: Intravenous Immunoglobulins; LT: Liver Transplantation; TCMR: T-cell-mediated rejection.

4. Discussion

This study demonstrates that especially preformed DSA are associated with an impaired (one-year) patient survival after LT, and sepsis-related mortality needs to be considered as a major cause. No remarkable adverse effects on graft survival were observed. Our data thereby indicate that DSA

presence may have an indirect effect on the outcome in adult LTs by interfering with the diagnosis of rejections and the decision-making in post-transplant IS and rejection therapies.

The incidence of DSA (22.2%) in our study is within the range of the published data. We observed 9.6% preformed and 10.8% de novo DSA in our cohort, which is comparable with previous reports (preformed: 4.7–22.2% [13,19,32]; de novo: 8–19.9% [16,19,21,22]). Similar to other authors, the DSA MFI threshold of our laboratory is >1000 [14,18,22]. This cut-off value lies within the lower range of published thresholds (e.g., Musat et al. 300 [15], Koch et al. \geq 1500 [20], Taner et al. \geq 2000 [32], Kaneku et al. \geq 5000 [21]). The distribution of antibody-classes in preformed DSA (Supplementary Table S1) showed a predominance of class I-DSA. However, the proportion of antibody classes in preformed DSA varies in previous reports, and at this point we cannot provide an adequate explanation for this finding. Out of 184 patients with preformed DSA, O'Leary et al. reported $n = 84$ (45.7%) class I-, and $n = 50$ (27.2%) class II-DSA [13]. As reported by Tamura et al. [33], 6/8 (75%) patients with preformed DSA presented solely class II-, and none presented with class I-DSA only. Vandevorde et al. [19] reported 14 patients with preformed DSA, with $n = 3$ (21.4%) having class I- and $n = 5$ (35.7%) having class II-DSA alone.

As there is no clear evidence on the effects of DSA in LT, we planned our analysis under consideration of potential pitfalls. First, we eliminated confounding risk factors for poor transplant outcome, such as high-urgency, multivisceral, and retransplantations [34–36] to achieve more homogeneous recipient groups in terms of demographic and clinical parameters. In a second step, we performed a 1:1 propensity score matching and assigned for each DSA-positive LT recipient a DSA-negative control with a similar predicted survival by the means of the BAR score and its individual components. For our analysis, we used the BAR score, as it achieves the highest accuracy in predicting the outcome after LT compared to other score systems such as MELD, D-MELD (donor age multiplied by recipient MELD), and DRI [28,29,37]. It consists of six items and includes key LT survival predictors as donor, recipient, and graft factors and is therefore very convenient in daily use. While some scores such as the DRM (donor to recipient model, 13 items) and the SOFT (survival outcome following liver transplant; 18 items) seem to outperform the BAR score in terms of the long-term survival [38], the BAR score has the best composition of usability (number of items) and accuracy and was therefore used for our analysis [28].

We observed two known sex-related effects in the analysis. First, the DSA-positive group consisted of significantly more women (48.7%) than the matched DSA-negative control (29.2%). This observation was even more evident in LT recipients with preformed DSA (65.3% women). The result is in accordance with the published data [13,15,32] and explained by previous pregnancies as the main trigger for anti-HLA antibodies prior to solid organ transplantation [39–42].

The second observed sex-related effect refers to the lower rate of LTs due to alcoholic cirrhosis in the DSA-positive group. The main indication for LT in men is still alcoholic liver cirrhosis [43, 44], and no publication so far had linked alcohol consumption in LT recipients with lower HLA antibody development. Hence, this result is more likely to reflect an epidemiological reality than an immunological origin.

Female donor-to-male recipient mismatch is another possible risk factor for graft loss [45]. However, in our analysis F-M donor-to-recipient mismatches seem not to be relevant factors in graft and patient survival. Female-to-male mismatch was more present in the DSA-negative cohort, which showed better organ and patient survival rates. Second, within the F-M-mismatched patients, only those with preformed DSA showed a significantly lower patient ($p = 0.004$) and graft survival ($p = 0.001$) compared to matched DSA-negative recipients after one year.

While we observed a higher rate of autoimmune liver diseases (AILD) and cryptogenic cirrhosis or NASH in the DSA-positive cohort, this was not found to have a negative impact on the outcome. In fact, in some studies AILD and cryptogenic cirrhosis/NASH have been shown to achieve a favorable graft and patient survival [46–48]. This also applied for the AILD patients in our study cohort (patient survival at one and five years: both 85.7%). DSA-positive AILD patients showed a non-significant

inferior patient survival compared to the DSA-negative AILD patients at one and five years (both 76.9% vs. 100%, $p = 0.156$).

DSA-positive LT recipients showed significantly shorter CIT and WIT compared with the matched DSA-negative control. An increase in these parameters is associated with a longer postoperative stay [49] and inferior transplant outcomes [34,50,51]. In our observation cohort, however, the DSA-positive patients showed a significantly longer ICU- and postoperative stay and worse short-term survival compared to DSA-negative LT recipients. The longer hospital stay in our cohort was mostly related to a prolonged rejection treatment in DSA-positive patients. No relevant differences in liver function parameters were observed between the groups, though three parameters differed at distinct time points without clinical correlates. Possible explanations for this result may be that DSA have no direct effect on liver function parameters, or the effects of DSA presence cannot be measured by the means of such routine liver function tests. In both situations, the results support the theory of some authors that the commonly used laboratory markers of the liver function are of limited predictive value in the interpretation of the course and prognosis of liver grafts [52,53].

With regard to patient and organ survival, we observed a significant difference in the one-year patient survival between the DSA-positive group and the unmatched DSA-negative control ($p = 0.003$). After the group matching, this effect was less pronounced and marginally missed the significance threshold ($p = 0.053$). However, a subgroup analysis revealed a significant correlation between the detection of preformed DSA and inferior patient survival after LT ($p = 0.008$). Regarding the 3-year and 5-year patient and graft survival, no significant differences were observed, regardless of the matching. Similarly, O'Leary et al. showed an association between preformed DSA and patient death [13] and, more recently, Tamura et al. [33] observed an inferior 90-day survival in living-donor LT recipients with preformed DSA. In accordance to O'Leary et al. [13], patients with high MFI (≥ 5000) preformed DSA showed an even more pronounced inferior survival compared to matched DSA-negative individuals ($p = 0.022$).

Additionally, Kaneku et al. have described the compromising effect of de novo DSA on patient and graft survival in the first year after LT [21]. In contrast to these results, the one-year survival of LT recipients with de novo DSA showed comparable outcomes to the matched DSA-negative control in our study. In turn, some authors could not confirm a correlation between DSA and inferior outcomes after LT [19,20]. These differences in study results may be caused by heterogeneous patient cohorts (analyzing first LTs, re-LTs and living donor LTs together), varying sample sizes, the use of different DSA detection methods, as well as the lack of a uniform definition for ABMR in LT.

Herein, this study is among those with the largest number of cases analyzed and the most recent observation period. Furthermore, all the DSA detections were performed on the Luminex® platform, which allows highly accurate DSA determination. Over the last decade, this method has shown its great value in antibody assessment compared to older techniques, such as the complement-dependent cytotoxicity test (CDC) or ELISA. Not only does it provide a higher sensitivity and specificity, but also a more detailed HLA antibody specification [9,54]. This has led to a broader understanding of DSA pathophysiology and immunohistology.

With respect to patient survival within the first year after LT, our findings strongly support the validity of the previously published results regarding the impact of DSA in LT. The rate of suspected rejections and performed biopsies, and especially histologically confirmed TCMR, was higher in the DSA-positive cohort than in the DSA-negative control group.

Furthermore, a remarkable finding of this study is that DSA patients have been treated significantly more often for (suspected) rejections. Especially in cases with the unclear or steroid-resistant deterioration of liver function and equivocal or missing biopsies, rejection therapy was augmented on clinical suspicion in the presence of DSA. In addition, patients with preformed DSA were treated in a highly vulnerable post-LT phase (6 days vs. 9 days in the DSA-negative cohort; $p = 0.003$). Another major finding of this study is that sepsis was observed significantly more often in DSA-positive LT-recipients and was the main cause of death in this cohort ($p = 0.046$). Koch et al. recently described

sepsis as a relevant cause of death in DSA-positive LT recipients [20]. All our 11 DSA-positive patients who succumbed to death due to sepsis received cytoreductive therapy consisting of either IVIGs, PP, ATG, Rituximab, or the combination of two or more.

This result is of utmost importance in the controversial discussion on the role of DSA in LT. We observed that the initiation or augmentation of rejection therapies in DSA-positive LT recipients with unclear delayed/impaired liver function may result in increased mortality due to infectious complications. This effect seems most pronounced in the first year after LT, particularly due to the increased vulnerability of LT recipients in this phase after transplantation, whereas the mid-term and long-term results were comparable for DSA-negative LT recipients.

Certainly, our study has limitations. First, the single-center, observational, retrospective study design has limitations that we are well aware of, so that our findings cannot be immediately extrapolated to all LTs as we excluded also high-urgency and re-transplantations. Nonetheless, this design ensured a relatively low heterogeneity regarding the clinical interpretation and therapeutic management of DSA detection. Second, the used MFI threshold of >1000 was at the lower end of previous publications. However, no international MFI threshold standard has been defined so far, and the MFIs in our analysis were considerably above the detection limit (4332 (1470–7336)).

Third, the used BAR score for matching is not yet an established and validated method. Despite the high predictive power of the BAR score regarding survival in LT, such matching can also cause a selection bias and may also explain the observation of reciprocal results in the long-term course of the examined matched collectives. Given the study's retrospective design, the therapeutic decision-making for rejection treatment is hard to reconstruct: some rejection treatment decisions were performed on a "ex juvantibus" basis and rejection protocols also changed throughout the follow-up. Additionally, histological samples taken before 2017 were rarely stained for C4d and no reevaluation according to the Banff 2016 criteria was performed. Although a reevaluation of the histological samples may have provided deeper understanding of the pathology of DSA in LT, it would have no impact on the past decision making. An important point is that the fear of DSA, but not actual ABMR, led to more robust immunosuppression treatments, which caused increased rates of sepsis-related death. Due to methodological issues at the time period analyzed, it was not possible to provide further information about complement-binding DSA or DSA subclasses. We decided not to include data on HLA classes and subclasses in the analysis, as a further breakdown would only increase the probability of a type I error and dilute the focus of the manuscript.

On the other hand, important insights into the role of DSA in LT were gained. While the immunological component for inferior short-term outcome after LT delivered by DSA cannot be excluded, our observation implies that immunosuppressive (over-) treatment notably increased morbidity due to infectious complications. Apparently, the trigger to initiate or increase rejection therapies in DSA-positive patients with equivocal histological findings and/or unclear deterioration of liver function is dramatically low due to a lack of clear diagnostic and therapeutic guidelines. Thus, the interpretation of DSA in LT should be considered very carefully.

We therefore propose to warily investigate suspected ABMR histologically before the initiation or augmentation of rejection treatment. Future steps need to be the development of a common consensus regarding MFI thresholds and simplified ABMR guidelines to better identify patients who may benefit from DSA detection and ABMR treatment in the context of LT.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/9/12/3986/s1>: Table S1: DSA characteristics of 113 DSA-positive patients who underwent LT from deceased donors between 1 January 2008, and 31 December 2015.

Author Contributions: Conceptualization, T.D., S.Ü., and R.Ö.; methodology, T.D., S.Ü., R.Ö.; validation, T.D. and S.Ü.; formal analysis, T.D., S.Ü., and M.J.; investigation, T.D. and S.Ü.; resources, T.D., S.Ü. and N.L.; data curation, T.D., S.Ü., P.V.R., L.W., and N.L.; writing—original draft preparation, T.D. and S.Ü.; writing—review and editing, R.Ö., N.L., M.J.; supervision, R.Ö., N.L., D.E., F.T., C.D., M.B., S.C., S.G.-K., W.S., M.S., P.R., and J.P.; project administration, T.D. and R.Ö. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and the Open Access Publication Fund of Charité—Universitätsmedizin Berlin. We gratefully thank Helena Ganterer and Jantje Black for proof-reading and editing the final manuscript. Any remaining errors are the responsibility of the authors.

Conflicts of Interest: The authors of this manuscript have no conflict of interest to disclose. The authors did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

1. Nankivell, B.J.; Kuypers, D.R. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet* **2011**, *378*, 1428–1437. [\[CrossRef\]](#)
2. Worthington, J.E.; Martin, S.; Al-Husseini, D.M.; Dyer, P.A.; Johnson, R.W. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* **2003**, *75*, 1034–1040. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Levine, D.J.; Glanville, A.R.; Aboyoun, C.; Belperio, J.; Benden, C.; Berry, G.J.; Hachem, R.; Hayes, D., Jr.; Neil, D.; Reinsmoen, N.L.; et al. Antibody-mediated rejection of the lung: A consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **2016**, *35*, 397–406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Hodges, A.M.; Lyster, H.; McDermott, A.; Rice, A.J.; Smith, J.D.; Rose, M.L.; Banner, N.R. Late antibody-mediated rejection after heart transplantation following the development of de novo donor-specific human leukocyte antigen antibody. *Transplantation* **2012**, *93*, 650–656. [\[CrossRef\]](#)
5. de Kort, H.; Mallat, M.J.; van Kooten, C.; de Heer, E.; Brand-Schaaf, S.H.; van der Wal, A.M.; Roufosse, C.; Roelen, D.L.; Bruijn, J.A.; Claas, F.H.; et al. Diagnosis of early pancreas graft failure via antibody-mediated rejection: Single-center experience with 256 pancreas transplantations. *Am. J. Transplant.* **2014**, *14*, 936–942. [\[CrossRef\]](#)
6. Del Bello, A.; Congy-Jolivet, N.; Danjoux, M.; Muscari, F.; Kamar, N. Donor-specific antibodies and liver transplantation. *Hum. Immunol.* **2016**, *77*, 1063–1070. [\[CrossRef\]](#)
7. Demetris, A.J.; Jaffe, R.; Tzakis, A.; Ramsey, G.; Todo, S.; Belle, S.; Esquivel, C.; Shapiro, R.; Markus, B.; Mroczek, E.; et al. Antibody-mediated rejection of human orthotopic liver allografts. A study of liver transplantation across ABO blood group barriers. *Am. J. Pathol.* **1988**, *132*, 489–502.
8. Demetris, A.J.; Bellamy, C.; Hubscher, S.G.; O’Leary, J.; Randhawa, P.S.; Feng, S.; Neil, D.; Colvin, R.B.; McCaughan, G.; Fung, J.J.; et al. 2016 Comprehensive Update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated Rejection. *Am. J. Transplant.* **2016**, *16*, 2816–2835. [\[CrossRef\]](#)
9. Lachmann, N.; Todorova, K.; Schulze, H.; Schonemann, C. Luminex(R) and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus. Med. Hemother.* **2013**, *40*, 182–189. [\[CrossRef\]](#)
10. O’Leary, J.G.; Demetris, A.J.; Friedman, L.S.; Gebel, H.M.; Halloran, P.F.; Kirk, A.D.; Knechtle, S.J.; McDiarmid, S.V.; Shaked, A.; Terasaki, P.I.; et al. The role of donor-specific HLA alloantibodies in liver transplantation. *Am. J. Transplant.* **2014**, *14*, 779–787. [\[CrossRef\]](#)
11. Steinhoff, G.; Wonigeit, K.; Pichlmayr, R. Analysis of sequential changes in major histocompatibility complex expression in human liver grafts after transplantation. *Transplantation* **1988**, *45*, 394–401. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Takacs, L.; Szende, B.; Monostori, E.; Rot, A.; Lapis, K.; Szecseny, A.; Ando, I. Expression of HLA-DR antigens on bile duct cells of rejected liver transplant. *Lancet* **1983**, *2*, 1500. [\[CrossRef\]](#)
13. O’Leary, J.G.; Kaneku, H.; Jennings, L.W.; Banuelos, N.; Susskind, B.M.; Terasaki, P.I.; Klintmalm, G.B. Preformed class II donor-specific antibodies are associated with an increased risk of early rejection after liver transplantation. *Liver Transplant.* **2013**, *19*, 973–980. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. O’Leary, J.G.; Kaneku, H.; Demetris, A.J.; Marr, J.D.; Shiller, S.M.; Susskind, B.M.; Tillery, G.W.; Terasaki, P.I.; Klintmalm, G.B. Antibody-mediated rejection as a contributor to previously unexplained early liver allograft loss. *Liver Transplant.* **2014**, *20*, 218–227. [\[CrossRef\]](#)
15. Musat, A.I.; Pigott, C.M.; Ellis, T.M.; Agni, R.M.; Levenson, G.E.; Powell, A.J.; Richards, K.R.; D’Alessandro, A.M.; Lucey, M.R. Pretransplant donor-specific anti-HLA antibodies as predictors of early allograft rejection in ABO-compatible liver transplantation. *Liver Transplant.* **2013**, *19*, 1132–1141. [\[CrossRef\]](#)

16. O'Leary, J.G.; Kaneku, H.; Banuelos, N.; Jennings, L.W.; Klintmalm, G.B.; Terasaki, P.I. Impact of IgG3 subclass and C1q-fixing donor-specific HLA alloantibodies on rejection and survival in liver transplantation. *Am. J. Transplant.* **2015**, *15*, 1003–1013. [[CrossRef](#)]
17. Kaneku, H.; O'Leary, J.G.; Taniguchi, M.; Susskind, B.M.; Terasaki, P.I.; Klintmalm, G.B. Donor-specific human leukocyte antigen antibodies of the immunoglobulin G3 subclass are associated with chronic rejection and graft loss after liver transplantation. *Liver Transplant.* **2012**, *18*, 984–992. [[CrossRef](#)]
18. O'Leary, J.G.; Kaneku, H.; Susskind, B.M.; Jennings, L.W.; Neri, M.A.; Davis, G.L.; Klintmalm, G.B.; Terasaki, P.I. High mean fluorescence intensity donor-specific anti-HLA antibodies associated with chronic rejection Postliver transplant. *Am. J. Transplant.* **2011**, *11*, 1868–1876. [[CrossRef](#)]
19. Vandevoorde, K.; Ducreux, S.; Bosch, A.; Guillaud, O.; Hervieu, V.; Chambon-Augoyard, C.; Poinot, D.; Andre, P.; Scoazec, J.Y.; Robinson, P.; et al. Prevalence, risk factors, and impact of donor-specific alloantibodies after adult liver transplantation. *Liver Transplant.* **2018**. [[CrossRef](#)]
20. Koch, M.; Marget, M.; Sterneck, M.; Fischer, L.; Thude, H.; Nashan, B. Limited impact of pre-existing donor specific HLA-antibodies (DSA) on long term allograft survival after first adult liver transplantation. *Hum. Immunol.* **2018**, *79*, 545–549. [[CrossRef](#)]
21. Kaneku, H.; O'Leary, J.G.; Banuelos, N.; Jennings, L.W.; Susskind, B.M.; Klintmalm, G.B.; Terasaki, P.I. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2013**, *13*, 1541–1548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Del Bello, A.; Congy-Jolivet, N.; Danjoux, M.; Muscari, F.; Lavayssiere, L.; Esposito, L.; Cardeau-Desangles, I.; Guitard, J.; Dorr, G.; Milongo, D.; et al. De novo donor-specific anti-HLA antibodies mediated rejection in liver-transplant patients. *Transpl. Int.* **2015**, *28*, 1371–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Del Bello, A.; Congy-Jolivet, N.; Muscari, F.; Lavayssiere, L.; Esposito, L.; Cardeau-Desangles, I.; Guitard, J.; Dorr, G.; Suc, B.; Duffas, J.P.; et al. Prevalence, incidence and risk factors for donor-specific anti-HLA antibodies in maintenance liver transplant patients. *Am. J. Transplant.* **2014**, *14*, 867–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Eurotransplant Foundation International. *Eurotransplant Manual Version 5.15, Chapter 5—ET Liver Allocation System (ELAS)*; Eurotransplant Foundation International: Leiden, The Netherlands, 2019.
25. Leppke, S.; Leighton, T.; Zaun, D.; Chen, S.C.; Skeans, M.; Israni, A.K.; Snyder, J.J.; Kasiske, B.L. Scientific Registry of Transplant Recipients: Collecting, analyzing, and reporting data on transplantation in the United States. *Transplant. Rev. (Orlando)* **2013**, *27*, 50–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Cameron, A.M.; Sullivan, B.E. Regulatory oversight in transplantation: There and back again. *JAMA Surg.* **2013**, *148*, 997–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Demetris, A.; Adams, D.; Bellamy, C.; Blakolmer, K.; Clouston, A.; Dhillon, A.P.; Fung, J.; Gouw, A.; Gustafsson, B.; Haga, H.; et al. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: Working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology* **2000**, *31*, 792–799. [[CrossRef](#)]
28. Dutkowski, P.; Oberkofler, C.E.; Slankamenac, K.; Puhan, M.A.; Schadde, E.; Mullhaupt, B.; Geier, A.; Clavien, P.A. Are there better guidelines for allocation in liver transplantation? A novel score targeting justice and utility in the model for end-stage liver disease era. *Ann. Surg.* **2011**, *254*, 745–753. [[CrossRef](#)]
29. Dutkowski, P.; Oberkofler, C.E.; Bechir, M.; Mullhaupt, B.; Geier, A.; Raptis, D.A.; Clavien, P.A. The model for end-stage liver disease allocation system for liver transplantation saves lives, but increases morbidity and cost: A prospective outcome analysis. *Liver Transplant.* **2011**, *17*, 674–684. [[CrossRef](#)]
30. Wiesner, R.; Edwards, E.; Freeman, R.; Harper, A.; Kim, R.; Kamath, P.; Kremers, W.; Lake, J.; Howard, T.; Merion, R.M.; et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 91–96. [[CrossRef](#)]
31. Feng, S.; Goodrich, N.P.; Bragg-Gresham, J.L.; Dykstra, D.M.; Punch, J.D.; DeRoy, M.A.; Greenstein, S.M.; Merion, R.M. Characteristics associated with liver graft failure: The concept of a donor risk index. *Am. J. Transplant.* **2006**, *6*, 783–790. [[CrossRef](#)]
32. Taner, T.; Gandhi, M.J.; Sanderson, S.O.; Poterucha, C.R.; De Goey, S.R.; Stegall, M.D.; Heimbach, J.K. Prevalence, course and impact of HLA donor-specific antibodies in liver transplantation in the first year. *Am. J. Transplant.* **2012**, *12*, 1504–1510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Tamura, K.; Tohyama, T.; Watanabe, J.; Nakamura, T.; Ueno, Y.; Inoue, H.; Honjo, M.; Sakamoto, K.; Takai, A.; Ogawa, K.; et al. Preformed donor-specific antibodies are associated with 90-day mortality in living-donor liver transplantation. *Hepatol. Res.* **2019**, *49*, 929–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Strasberg, S.M.; Howard, T.K.; Molmenti, E.P.; Hertl, M. Selecting the donor liver: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* **1994**, *20 Pt 1*, 829–838. [[CrossRef](#)]
35. Brandsaeter, B.; Hockerstedt, K.; Friman, S.; Ericzon, B.G.; Kirkegaard, P.; Isoniemi, H.; Olausson, M.; Broome, U.; Schmidt, L.; Foss, A.; et al. Fulminant hepatic failure: Outcome after listing for highly urgent liver transplantation-12 years experience in the nordic countries. *Liver Transplant.* **2002**, *8*, 1055–1062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rana, A.; Robles, S.; Russo, M.J.; Halazyn, K.J.; Woodland, D.C.; Witkowski, P.; Ratner, L.E.; Hardy, M.A. The combined organ effect: Protection against rejection? *Ann. Surg.* **2008**, *248*, 871–879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Schlegel, A.; Linecker, M.; Kron, P.; Gyori, G.; De Oliveira, M.L.; Mullhaupt, B.; Clavien, P.A.; Dutkowski, P. Risk Assessment in High- and Low-MELD Liver Transplantation. *Am. J. Transplant.* **2017**, *17*, 1050–1063. [[CrossRef](#)]
38. de Boer, J.D.; Putter, H.; Blok, J.J.; Alwayn, I.P.J.; van Hoek, B.; Braat, A.E. Predictive Capacity of Risk Models in Liver Transplantation. *Transplant. Direct* **2019**, *5*, e457. [[CrossRef](#)]
39. Del Bello, A.; Congy-Jolivet, N.; Audry, B.; Antoine, C.; Esposito, L.; Hebral, A.L.; Kamar, N. Impact of transplant accessibility for sensitized patients by avoiding unacceptable antigens. *Liver Transplant.* **2017**, *23*, 880–886. [[CrossRef](#)]
40. Dumortier, J.; Dedic, T.; Erard-Poinsot, D.; Rivet, C.; Guillaud, O.; Chambon-Augoyard, C.; Bosch, A.; Lachaux, A.; Couchonnal, E.; Thauinat, O.; et al. Pregnancy and donor-specific HLA-antibody-mediated rejection after liver transplantation: “Liaisons dangereuses”? *Transpl. Immunol.* **2019**, *54*, 47–51. [[CrossRef](#)]
41. Nguyen, L.S.; Coutance, G.; Salem, J.E.; Ouldamar, S.; Lebreton, G.; Combes, A.; Amour, J.; Laali, M.; Leprince, P.; Varnous, S. Effect of recipient gender and donor-specific antibodies on antibody-mediated rejection after heart transplantation. *Am. J. Transplant.* **2019**, *19*, 1160–1167. [[CrossRef](#)]
42. Higgins, R.; Lowe, D.; Daga, S.; Hathaway, M.; Williams, C.; Lam, F.T.; Kashi, H.; Tan, L.C.; Imray, C.; Fletcher, S.; et al. Pregnancy-induced HLA antibodies respond more vigorously after renal transplantation than antibodies induced by prior transplantation. *Hum. Immunol.* **2015**, *76*, 546–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kwong, A.; Kim, W.R.; Lake, J.R.; Smith, J.M.; Schladt, D.P.; Skeans, M.A.; Noreen, S.M.; Foutz, J.; Miller, E.; Snyder, J.J.; et al. OPTN/SRTR 2018 Annual Data Report: Liver. *Am. J. Transplant.* **2020**, *20*, 193–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Marroni, C.A.; Fleck, A.M., Jr.; Fernandes, S.A.; Galant, L.H.; Mucenic, M.; de Mattos Meine, M.H.; Mariante-Neto, G.; Brandao, A.B.M. Liver transplantation and alcoholic liver disease: History, controversies, and considerations. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 2785–2805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lai, Q.; Giovanardi, F.; Melandro, F.; Larghi Laureiro, Z.; Merli, M.; Lattanzi, B.; Hassan, R.; Rossi, M.; Mennini, G. Donor-to-recipient gender match in liver transplantation: A systematic review and meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 2203–2210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Adam, R.; Karam, V.; Delvart, V.; O’Grady, J.; Mirza, D.; Klempnauer, J.; Castaing, D.; Neuhaus, P.; Jamieson, N.; Salizzoni, M.; et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 675–688. [[CrossRef](#)]
47. Ilyas, J.A.; O’Mahony, C.A.; Vierling, J.M. Liver transplantation in autoimmune liver diseases. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2011**, *25*, 765–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Thuluvath, P.J.; Hanish, S.; Savva, Y. Liver Transplantation in Cryptogenic Cirrhosis: Outcome Comparisons Between NASH, Alcoholic, and AIH Cirrhosis. *Transplantation* **2018**, *102*, 656–663. [[CrossRef](#)]
49. Pan, E.T.; Yoeli, D.; Galvan, N.T.N.; Kueht, M.L.; Cotton, R.T.; O’Mahony, C.A.; Goss, J.A.; Rana, A. Cold ischemia time is an important risk factor for post-liver transplant prolonged length of stay. *Liver Transplant.* **2018**, *24*, 762–768. [[CrossRef](#)]
50. Mathur, A.K.; Heimbach, J.; Steffick, D.E.; Sonnenday, C.J.; Goodrich, N.P.; Merion, R.M. Donation after cardiac death liver transplantation: Predictors of outcome. *Am. J. Transplant.* **2010**, *10*, 2512–2519. [[CrossRef](#)]
51. Jochmans, I.; Fieuws, S.; Tieken, I.; Samuel, U.; Pirenne, J. The Impact of Implantation Time During Liver Transplantation on Outcome: A Eurotransplant Cohort Study. *Transplant. Direct* **2018**, *4*, e356. [[CrossRef](#)]

52. Jara, M.; Dziodzio, T.; Malinowski, M.; Luttgert, K.; Nikolov, R.; Ritschl, P.V.; Ollinger, R.; Pratschke, J.; Stockmann, M. Prospective Assessment of Liver Function by an Enzymatic Liver Function Test to Estimate Short-Term Survival in Patients with Liver Cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* **2019**, *64*, 576–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Jara, M.; Malinowski, M.; Luttgert, K.; Schott, E.; Neuhaus, P.; Stockmann, M. Prognostic value of enzymatic liver function for the estimation of short-term survival of liver transplant candidates: A prospective study with the LiMAX test. *Transpl. Int.* **2015**, *28*, 52–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zachary, A.A.; Vega, R.M.; Lucas, D.P.; Leffell, M.S. HLA antibody detection and characterization by solid phase immunoassays: Methods and pitfalls. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *882*, 289–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

1. **Ünlü S**, Lachmann N, Jara M, Ritschl PV, Wiering L, Eurich D, Denecke C, Biebl M, Chopra S, Gül-Klein S, Schöning W, Schmelzle M, Reinke P, Tacke F, Pratschke J, Ollinger R, Dziodzio T. Treatment of Anti-HLA Donor-Specific Antibodies Results in Increased Infectious Complications and Impairs Survival after Liver Transplantation. *J Clin Med* 2020; 9(12).

PMID: 33317012; DOI: [10.3390/jcm9123986](https://doi.org/10.3390/jcm9123986)

Impact Factor: 3.303

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Professor Öllinger sowie meinem Betreuer Dr. med. Dziodzio bedanken. Ohne ihren Zeitaufwand und ihr Know-How wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ebenfalls möchte ich mich bei allen Ko-Autoren der Studie für das Lesen, die konstruktiven Anregungen und Verbesserungsvorschläge bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die meinen Werdegang erst möglich gemacht haben, sowie meinen Geschwistern für ihre Unterstützung und Ermunterung in jeder Lebenslage. Bedanken möchte ich mich auch bei Felipe, der mir während aller Höhen und Tiefen beratend zur Seite stand und mir half, mich stets auf das Wesentliche zu fokussieren.