

UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE DIN CRAIOVA

SCOALA DOCTORALA

TEZA DE DOCTORAT

Tema de cercetare:            **Anticorpilor anti-HLA in Transplantul de Organe**

Student Doctorand:            Prof. Asociat *Alin Lucian Girnita*, M.D., D-ABHI

Conducator Doctorat:        Prof. Univ. Dr. *Andrei Adrian Tica*, M.D., Ph.D.

Comisie de indrumare:        Prof. Univ. Dr. *Cristian Georgescu* M.D., Ph.D.

Conf. Univ. Dr. *Eugen Osiac* Ph.D.

Craiova, 18 Decembrie 2015

## Index

<a href="#">Prefata</a> .....	2
<a href="#">Index</a> .....	3
<a href="#">Parte Generala</a> .....	6
<a href="#">Introducere</a> .....	6
<a href="#">Cunostinte generale</a> .....	10
Criteriile histologice pentru rejectia mediata de anticorpi .....	10
<a href="#">Forme de rejectie mediata de anticorpi</a> .....	12
<a href="#">Detectarea si identificarea anticorpilor</a> .....	18
<a href="#">Rejetul specific de organ</a> .....	26
<a href="#">Partea Speciala</a> .....	32
<a href="#">Contributii personale</a> .....	33
<a href="#">Obiective specifice</a> .....	33
<a href="#">Anticorpi anti-<u>HLA inainte de transplantation</u></a> .....	34
Afinitatea anticorpilor poate prezice rezultatul <a href="#">crossmatch-ului</a> .....	34
<a href="#">Monitorizarea anticorpilor HLA in candidatul de transplant renal</a> .....	39
<a href="#">Candidatul de transplant cardiac</a> .....	51
<a href="#">Candidatul de transplant renal</a> .....	58
<a href="#">Monitorizarea anticorpilor HLA dupa transplant</a> .....	64
<a href="#">Cind apar anticorpii post-transplant?</a> .....	64
<a href="#">Impactul clinico-patologic al anticorpilor post-transplant</a> .....	67
<a href="#">Anticorpii HLA si transplantul cardiac pediatric</a> .....	87
<a href="#">Anticorpii HLA si transplantul renal</a> .....	90
<a href="#">Anticorpii HLA si transplantul hepatic-intestinal</a> .....	109
<a href="#">Concluzii</a> .....	116
<a href="#">Sumar al publicatiilor autorului</a> .....	117
<a href="#">Bibliografie</a> .....	122

**Cuvinte cheie:** Ab, antibody; AMR, antibody mediated rejection; BMNR LLPC, bone marrow niche resident long lived plasma cell; CDC-PRA, complement-dependent cytotoxic panel reactive antibody; cPRA, calculated panel reactive antibody; DSA, donor-specific antibody; ER, endoplasmic reticulum; FDA, Food and Drug Administration; iAb, immunodominant antibody; iDSA, immunodominant donor-specific antibody; IRB, Institutional Review Board; IVIg, intravenous immune globulin; MCS, mean channel shifts; MFI, mean fluorescence intensity; PI, proteasome inhibitor; PRA, panel reactive antibody; SAB, single antigen bead; ACR, acute cellular rejection; ASHI, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; BKV, BK virus; Bortez, bortezomib; CMV, cytomegalovirus; HLA, human leukocyte antigen; MAR, mixed acute rejection; MMF, mycophenolate mofetil; POD, post-op day; rATG, rabbit antithymocyte globulin; Ritux, rituximab; SCr, serum creatinine;

## **Partea Generala**

Multiple insuficiente de organ beneficiaza astăzi de transplant alogrefelor vasculare: rinichi, pancreas, inima, plămân, intestin, ficat, extremitati, grefe faciale etc. De asemenea, transplantul grefelor de țesuturi nevascularizate, cum ar fi celulele stem hematopoietice sau alte tipuri de celule stem a cunoscut un avant substanțial.

În perioada de după transplant, respingerea grefei mediată de anticorpi ( AMR ) reprezintă un factor de risc major pentru disfuncția de alogrefă și / sau pierderea grefei.

Detectarea anticorpilor circulanți anti HLA în transplantul de organe solide s-a îmbunătățit continuu în ultimul deceniu. Atât testele celulare, cit și cele în fază solidă sunt utilizate pentru detectarea anticorpilor anti-HLA. Platformele robotice multiplex și tehnicile bazate pe flow sunt raportate ca fiind cele mai sensibile pentru detectarea anticorpilor, urmate de metode ca ELISA și citotoxicitate (CDC). Rezultatele metodelor de testare în fază solidă par să fie mai puțin influențate de factori perturbatori, ca globuline tip IgM , auto-anticorpi și anticorpi non-HLA, anticorpi terapeutici citotoxici.

Având în vedere avantajele și limitele fiecărui test, este de dorit să folosim mai degrabă o combinație, decât o singură metodă , pentru a oferi cea mai bună abordare imunopatologică și pentru a determina cantitativ și calitativ anticorpii anti - HLA la pacienții transplantați.

## **Partea Speciala. Contribuții personale**

Am avut șansa de a studia acest domeniu în ultimii cincisprezece ani . Interesul major al activității de cercetare prezent este reprezentat de dinamica anticorpilor anti - HLA atât înainte, cât și după

transplantul de organe solide . Cunoștințele despre dinamica allo - răspunsului umoral sunt de o importanță fundamentală atât în urmărirea post-operatorie, cât și în aplicarea protocoalelor clinice și terapeutice , și pentru prognosticul grefei/pacientului.

Obiectivele acestei teze vizează adesea descrierea dinamicii răspunsului imun umoral față de polimorficele antigene HLA, atât în candidații pentru transplant, cât și la pacienții transplantați , în contextul diferitelor strategii terapeutice moderne.

Principalele ipoteze sunt: a ) candidații cu anticorpi anti-HLA nu arată o tendință naturală de scădere a nivelului și spectrului de acțiune al acestor anticorpi ; b ) profilul acestor anticorpi (afinitate, aviditate, clasă, specificitate de epitop, antigen și grup, tip și subtip de imunoglobulină) și răspunsul terapeutic în rejecția timpurie mediată de anticorpi (AMR) sunt diferite față de rejecția umorală tardivă ; c) răspunsul terapeutic este, de asemenea, diferit în rejecția timpurie mediată de anticorpi față de rejecția umorală tardivă ; d ) răspunsul terapeutic este influențat de profilul anticorpilor.

Aplicațiile clinice imediate sunt reprezentate, pe de o parte, prin creșterea transplantabilității în candidații cu un nivel ridicat de anticorpi și , pe de altă parte, prin strategii de control a mecanismelor patologice mediate de răspunsul umoral împotriva alogrefelor .

### **Anticorpilor HLA Înainte de Transplant**

Afinitatea anticorpilor poate prezice valoarea crossmatch-urilor . Afinitatea anticorpilor donor-specifici (DSA) se corelează cu rezultatele crossmatch-urilor. Acesta a fost primul studiu pentru a evalua aceste aspecte bazat pe consensul centrelor de transplant din Statele Unite.

### **Monitorizarea Anticorpilor HLA în Candidații pentru Transplant Renal**

Acest studiu reprezintă primul demers iterativ prospectiv de tratament bazat de inhibitorii de proteazom, pentru reducerea nivelurilor de anticorpi HLA. Studiul a avut cinci faze clinice, incluzând pacienți cu un nivel înalt de anticorpi, necesitând multiple studii de diluție, analize complexe cu specificitate de clasă și de epitop. Acest raport oferă, de asemenea, dovezi că schemele terapeutice cu bortezomib pot oferi o bună desensibilizare pentru anticorpilor anti-HLA în pacienții candidați la transplant de rinichi, fără terapie IVIg concomitentă (socotită drept "gold standard").

### **Monitorizarea Anticorpilor HLA în Candidații pentru Transplant Cardiac**

Am raportat că sensibilizarea înainte de transplant a fost asociată cu creșterea mortalității pe listele de așteptare, cu o mortalitate crescută după listare (indiferent de transplantele ulterioare), și cu dezvoltarea mai timpurie a bolii coronariene post-transplant. Mai mult, am raportat că desensibilizarea este urmată cu succes de transplant cardiac, atât pentru adulți, cât și la copii și adolescenți. Reactivitatea anticorpilor măsurată prin Luminex MFI poate fi utilizată pentru a monitoriza răspunsul la protocoalele de desensibilizare în candidați de transplant cardiac, fără a mai necesita un crossmatch prospectiv.

## **Monitorizarea Anticorpilor HLA în Candidații pentru Transplant Pulmonar**

Am aratat ca o istorie detaliată înainte de transplant, dar și metode de testare cu mare sensibilitate sunt foarte utile în candidați transplant pulmonar, indiferent de complexitate și de vârstă..

### **Anicorpilor Anti-HLA după Transplant**

Pe scurt, pentru întrebarea " Când sunt anticorpilor anti - HLA *de novo* dezvoltati / detectati ? ", am aratat că: 1 ) raspunsul umoral timpuriu ( < 6 luni ) este dominat de anticorpilor de clasă I și se asociază cu rejecții tip " early" AMR, în timp ce 2 ) raspunsul umoral tardiv ( >6 luni ) este dominat de anticorpilor de clasă II și se asociază cu rejecții tip " late" AMR

### **Impactul Anticorpilor anti - HLA in Transplant Pulmonar**

Am aratat ca anticorpilor anti-HLA sunt asociati cu formele cu grad inalt de rejecție acuta perivasculara. Semnificatia de cercetare: Acesta este primul raport în literatura pentru a demonstra asocierea anticorpilor anti-HLA cu rejecția acuta în transplantul pulmonar, cu implicatii terapeutice imediate. Studiu clinic prospectiv . Se deschide totodata domeniul rejecțiilor acute mixte, celulare și umorale, în transplantul pulmonar, cu consecințe asupra strategiilor de monitorizare și tratament post-transplant .

In alt studiu prospectiv, am reusit sa evintiem faptul ca anticorpilor HLA reprezinta factori de risc și pentru bronșiolita limfocitara, considerata forma de rejecție acuta a cailor respiratorii, urmate de rejecție cronica și disfuncții ale alogrefei de plămân . Acesta este primul raport în literatura care demonstreaza asocierea anticorpilor HLA cu rejecției acute al cailor respiratorii în transplantul pulmonar, ca un stadiu intermediar spre disfuncție alogrefa cronice.

Depunerea de C4d în alogrefa pulmonara este asociata cu anticorpilor HLA circulanti. Semnificatia de Cercetare : Acesta este primul raport în literatura pentru a demonstra asocierea anticorpilor HLA alloantibody cu activarea complementului in spatiul subendotelial al alogrefei pulmonare ( C4d colorat pe biopsii fixate in parafină). Acesta studiu arată că anticorpilor nu reprezintă doar un factor de risc, ci au rol patogenetic in respingerea alogrefei de plămân . Se dezvoltă astfel domeniul definirii criteriilor patologice al rejecției mediate de anticorpilor in transplantul pulmonar .

- Anticorpilor HLA sunt asociati cu niveluri crescute de C4d solubil in lavajul bronho-alveolar al pacientilor cu transplant pulmonar
- Anticorpilor HLA sunt asociati cu sindromul de bronșiolita obliteranta și insuficienta de graft
- Anticorpilor și protocoale terapeutice HLA-specifice în transplant pulmonar

### **Impactul Anticorpilor anti - HLA in Transplant Cardiac**

- Anticorpilor HLA și rejecția acuta in transplantul cardiac pediatric

- - Anticorpul anti- HLA de Subclasă IgG3 se corelează cu rejecția severă de transplant cardiac

#### **Impactul Anticorpilor Anti-HLA în Transplantul Renal**

- Anticorpul HLA și matching-ul la nivel molecular
- Anticorpul HLA este asociat cu depunere focală de C4d în transplantul renal
- Anticorpul în monitorizarea scăderii nivelului de imunosupresie
- Anticorpul ca variabilă în studii randomizate controlate
- Terapie pe baza de inhibitor de proteazom în rejecția mediată de anticorpi
- Subtipul IgG3 este un marker de "Late" AMR
- Subtipurile IgG și scorul de rejecție

#### **Impactul Anticorpilor Anti-HLA în Transplantul Hepatic-Intestinal**

- Absența anticorpilor HLA se corelează cu toleranța în transplantul hepatic
- Identificarea de anticorpi în biopsia alograftului

Pe scurt, autorul prezentei teze a publicat în domeniul răspunsului imun umoral în transplantul de organe solide :

- 38 manuscrise ISI;
- Peste 150 de lucrări de cercetare (indexate PubMed) ;
- H - index = 23 ( Scopus ) ;
- 1144 citări / 847 (invocând articole fără auto- citări) , ISI Thomson Reuters Web of Science