

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

RELEVANȚA CLINICĂ A ANTICORPILOR ANTI HLA

ÎN TRANSPLANTUL RENAL

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. CONSTANTINESCU ILEANA

Student-doctorand:

MĂRUNȚELU ION

2022

Cuprinsul tezei de doctorat

Listă de abrevieri.....	2
Introducere.....	3
Capitolul I. Partea generală.....	6
1. Insuficiența renală cronică: clasificare, cauze și tratamentul de substituție al funcției renale.....	6
2. Genele și moleculele HLA și transplantul renal.....	8
2.1. Genele HLA.....	9
2.2 Rolul moleculelor HLA.....	10
2.3. Rolul potrivirii genelor HLA în transplantul renal.....	11
3. Mecanisme de formare a anticorpilor anti HLA dependente de implicarea celulelor T specifice antigenului.....	12
4. Aloreconoașterea celulelor T și rolul acesteia în rejecția de alogrefă renală.....	13
5. Leziuni mediate de anticorp.....	14
6. Detectia anticorpilor anti HLA prin tehnologia Luminex.....	15
7. Potrivirea perechilor utilizând programul HLA MatchMaker și PIRCHE.....	17
8. Toleranța în transplantul renal.....	18
9. Tipurile de imunosupresoare utilizate în transplant.....	19
10. Diagnosticul histopatologic al rejecției de alogrefă renală.....	22
Capitolul II. Contribuții personale.....	26
1. Ipoteza de lucru.....	26
2. Pacienți și metode.....	26
3. Studiul I: Relevanța anticorpilor anti HLA în monitorizarea pacienților cu transplant renal..	28
3.1. Introducere.....	28
3.2. Pacienți și metode.....	30
3.3. Rezultate.....	32
3.4. Discuții.....	52
4. Studiul 1I: Studiul asocierii genelor HLA cu insuficiența renală cronică.....	56
4.1. Introducere.....	56
4.2. Pacienți și metode.....	57
4.3. Rezultate.....	60
4.4. Discuții.....	101

5. Concluzii și contribuții personale.....	105
5.1. Concluzii.....	105
5.2. Contribuții personale.....	108
Bibliografie.....	109
Anexe.....	130

Lista cu lucrări științifice publicate

Articole publicate în reviste de specialitate indexate ISI

Măruștelu I, Nistor CE, Cristea BM, Rotarescu CA, Caragea AM, Tizu M, Constantinescu I. Retrospective Study from a Single Center in Romania of 347 Renal Transplant Patients Treated with Tacrolimus, Mycophenolate, and Steroids to Evaluate the Association Between Anti HLA Antibodies and 5-Year Graft Survival. *Ann Transplant*. 2022 Aug 12;27:e937267. doi: 10.12659/AOT.937267. PMID: 35957504; PMCID: PMC9380442.

Maruntelu I, Preda CM, Sandra I, Istratescu D, Chifulescu AE, Manuc M, Diculescu M, Talangescu A, Tugui L, Manuc T, Stroie T, Andrei AC, Tieranu C, Constantinescu I. HLA Genotyping in Romanian Adult Patients with Celiac Disease, their First-degree Relatives and Healthy Persons. *J Gastrointest Liver Dis*. 2022 Jun 12;31(2):191-197. doi: 10.15403/jgld-4187. PMID: 35694992.

Măruștelu I, Cristea BM, Omer S, Preda CM, Constantinescu I. Relevance of HLA gene polymorphisms in Romanian patients with chronic renal insufficiency undergoing renal transplantation. *J Clin Lab Anal*. 2021 Dec;35(12):e24075. doi: 10.1002/jcla.24075. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34704282; PMCID: PMC8649334.

Tizu M, **Măruștelu I**, Cristea BM, Nistor C, Ishkitiev N, Mihaylova Z, Tsikandelova R, Miteva M, Caruntu A, Sabliov C, Calenic B, Constantinescu I. PLGA Nanoparticles Uptake in Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth and Oral Keratinocyte Stem Cells. *J Funct Biomater*. 2022 Jul 31;13(3):109. doi: 10.3390/jfb13030109. PMID: 35997447; PMCID: PMC9397094.

Vacaru RP, Didilescu AC, Constantinescu I, **Măruștelu I**, Tănase M, Stanciu IA, Kaman WE, Brand HS. Salivary Enzymatic Activity and Carious Experience in Children: A Cross-Sectional Study. *Children (Basel)*. 2022 Mar 2;9(3):343. doi: 10.3390/children9030343. PMID: 35327715; PMCID: PMC8947358.

Sorohan BM, Sinescu I, Tacu D, Bucșa C, Țincu C, Obrișcă B, Berechet A, Constantinescu I, **Măruștelu I**, Ismail G, Baston C. Immunosuppression as a Risk Factor for De Novo Angiotensin II Type Receptor Antibodies Development after Kidney Transplantation. *J Clin Med*. 2021 Nov 18;10(22):5390. doi: 10.3390/jcm10225390. PMID: 34830672; PMCID: PMC8625545.

Sorohan BM, Ismail G, Berechet A, Obrișcă B, Constantinescu I, **Măruștelu I**, Tacu D, Baston C, Sinescu I. The early impact of preformed angiotensin II type 1 receptor antibodies on graft function in a low immunological risk cohort of kidney transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2021 Jun;66:101389. doi: 10.1016/j.trim.2021.101389. Epub 2021 Apr 7. PMID: 33838295.

Articole publicate în reviste de specialitate indexate PubMed

Maruntelu I, Caragea AM, Tizu M, Constantinescu I. SARS-CoV-2 diagnosis: a single-centre experience. *J Med Life*. 2021 Mar-Apr;14(2):257-261. doi: 10.25122/jml-2021-0064. PMID: 34104250; PMCID: PMC8169149.

Rezumatul tezei de doctorat

Insuficiența renală cronică este o problemă de sănătate publică la nivel mondial, asociată cu un prognostic relativ scăzut de supraviețuire, cu frecvență mai mare în populația adultă, și mai mică la copii și adolescenți (Warady and Chadha, 2007).

Insuficiența renală cronică include toate gradele sau stadiile de scădere a funcției renale care pot varia de la risc la leziune renală mică, moderată și severă (Chen et al., 2019). Conform inițiativei privind calitatea rezultatelor în domeniul bolilor renale (Levin and Stevens, 2014), insuficiența renală cronică este asociată cu o rată de filtrare glomerulară (RFG) mai mică de 60 ml/min/1.73 m² care persistă mai mult timp. Pentru a preveni agravarea bolii sau apariția complicațiilor asociate incapacității rinichilor de a elimina toxinele acumulate în organism (hipertensiune arterială rezistentă la tratament, encefalopatia uremică, dezechilibre hidroelectrolitice asociate cu risc mare de deces) se efectuează dializa (peritoneală/hemodializa) sau transplantul renal pentru substituția funcției renale.

În lume, cea mai frecventă cauză a insuficienței renale cronice este reprezentată de nefropatia diabetică (Vallon and Komers, 2011) în care hiperglicemia determină hiperfiltrare cu lezarea nefronilor, cu formarea produșilor finali ai glicolizei în membrana bazală glomerulară și în matricea extracelulară a nefronului, și creșterea producției de citokine (precum IL1 și TNF) și factori de creștere (precum factorul de creștere beta (TGF β) și factorul de creștere al endoteliului vascular (VEGF)) (Toth-Manikowski and Atta, 2015). Ca urmare a eliberării tuturor factorilor menționați anterior se pot produce 3 modificări histologice majore, precum îngroșarea membranei bazale glomerulare, expansiunea mezangială și scleroza glomerulară, fiecare dintre ele determinând sau fiind asociată cu o pierdere ireversibilă a funcției nefronilor (Lin and Susztak, 2016; Pourghasem et al., 2015).

A 2-a cea mai frecventă cauză a insuficienței renale cronice o reprezintă nefropatia hipertensivă în care hipertensiunea persistentă va determina îngroșarea pereților arteriali renali (Stompór and Perkowska-Ptasińska, 2020). Îngroșarea pereților arteriali renali este asociată cu o reducere a fluxului de sânge către glomeruli, fapt ce va determina activarea sistemului renină-angiotensină-aldosteron (Fountain and Lappin, 2022). Sistemul renină-angiotensină-aldosteron activat induce o nouă creștere a tensiunii arteriale care va determina

mai multă îngroșare a pereților arteriali ce poate merge până la necroza ischemică a nefronilor (Fountain and Lappin, 2022).

Bolile vasculare (precum stenoza de arteră renală, embolia de artera renală, nefroscleroză hipertensivă, sau tromboza de venă renală) sau glomerulare (precum nefropatia membranoasă, sindromul Alport, sau glomerulonefrită membrano-proliferativă) și insuficiența renală acută netratată sau nereactivă la tratament reprezintă alte cauze frecvente ale insuficienței renale cronice (Kang and Park, 1987).

Dializa poate favoriza unele complicații, precum calcificarea arterelor coronare care pot conduce chiar la apariția unor boli cardiovasculare (Volodarskiy et al., 2016). Aceste complicații pot fi consecința activării sistemului imun al pacientului (granulocite, anticorpi de tip IgG și sistemul complement, eliberare de citokine precum IL-1) împotriva membranelor semi-permeabile utilizate (Volodarskiy et al., 2016).

Complicațiile asociate dializei dar și necesitatea de a reduce costurile cu tratamentul și spitalizarea de zi frecventă a pacienților face din transplantul renal metoda de elecție pentru substituția funcției renale.

Transplantul de rinichi este o intervenție chirurgicală care implică înlocuirea unui rinichi „defect” cu un rinichi sănătos de la un donator (în viață, în general o rudă apropiată a primitorului, sau de la un donator în moarte cerebrală). Rinichiul transplantat este de obicei grefat mai jos decât poziția anatomică normală, în special, în fosa iliacă dreaptă (datorită abordului vascular mai facil). Acesta este cel mai frecvent tip de transplant și care are o rată foarte mare de succes.

Descoperirea și înțelegerea sistemului imun în general, și al sistemului HLA și al medicamentelor imunosupresoare în principal, au făcut din transplantul renal cea mai performantă formă de transplant de organe solide. În 2011, M Tonelli et al constată că riscul cardiovascular și riscul de mortalitate au fost mai mici în rândul pacienților cu transplant renal comparativ cu pacienții care efectuează dializă (Tonelli et al., 2011). Observația a fost făcută în urma unei meta-analize în care au fost incluși aproape 2 milioane de pacienți (cu transplant și dializă) din cadrul a 110 studii publicate în bazele de date MEDLINE și EMBASE (Tonelli et al., 2011).

Potrivit Agenției Naționale de Transplant (“Statisticile anuale,” n.d.), la sfârșitul anului 2021, 4918 de pacienți români cu insuficiență renală cronică se aflau pe lista de așteptare pentru un transplant renal de la donator viu/în moarte cerebrală. Dintre aceștia, 480 de pacienți cu insuficiență renală cronică au fost înscriși numai în 2021.

La momentul actual, biomarkeri precum ureea și creatinina serică și urinară nu permit stabilirea riscului de apariție al insuficienței renale cronice, ei fiind utilizați pentru stabilirea diagnosticului de insuficiență renală cronică și monitorizarea răspunsului la diferite tipuri de tratament. Pentru a corecta acest neajuns, o serie de cercetări au vizat mecanismele imunologice ale apariției bolilor în general, și al insuficienței renale cronice în particular. Aceste cercetări au identificat ca posibili factori de risc genele HLA (human leukocyte antigen) de clasa I și de clasa a II-a pentru anumite boli precum cele autoimune dar nu au reușit să identifice cu exactitate mecanismele asocierii lor (Rich et al., 2012).

Mai multe medicamente cu mecanisme imunologice diferite au fost dezvoltate pentru a favoriza transplanturile renale de la donatori HLA non-identici în moarte cerebrală sau de la donatori vii și pentru a preveni rejețul hiperacut, acut sau cronic al alogrefei renale și insuficiența de organ. Medicamentele imunosupresoare pot provoca, însă, la pacienții transplantați diabet zaharat pe termen scurt și lung, neoplazii de novo, infecții bacteriene sau virale (Hussain and Khan, 2021).

Chiar și după ajustarea imunosupresoarelor și dezvoltarea de noi medicamente (Kalluri and Hardinger, 2012), prezența unor rate diferite de supraviețuire a grefei raportate la 5 ani a alogrefelor renale după transplant (de Sousa et al., 2018; Phillipott et al., 2022; Zecher et al., 2017) poate fi încă legată fie de rejețul umoral indus de anticorpii HLA (Zhang, 2018) asociat cu leziunile vaselor mici (Halloran et al., 2014), fie de rejețul celular.

Lipsa datelor cu privire la incidența anticorpilor anti HLA la pacienții înscriși pe lista de așteptare pentru un transplant renal, rolul anticorpilor anti HLA de novo în apariția rejețului, frecvența rejețurilor, nivelul imunosupresoarelor din sânge asociate cu apariția de novo a anticorpilor anti HLA, utilizarea epitopilor HLA pentru identificarea riscului de apariție a anticorpilor anti HLA de novo precum și efectele prezenței acestui tip de anticorp în rândul pacienților cu transplant renal din România au constituit motivele alegerii temei de cercetare.

Formularea ipotezei de cercetare a luat în considerare unele din observațiile reliefate în studiile anterioare, adaptată populației studiate și practicii centrului de transplant de unde au fost recrutați pacienții incluși cercetare.

Luând în considerare aspectele mai sus menționate, în cadrul cercetării doctorale ne-am propus să evaluăm pentru prima dată prezența și importanța Ac anti HLA pe un eșantion de pacienți transplantați renal și să aducem o contribuție în domeniu, oferind un răspuns la o parte din incertitudinile semnalate în studiile anterioare.

În partea generală a lucrării doctorale au fost descrise genele HLA- tipuri, structura și funcții, asocierea cu diverse boli; mecanismele apariției (alorecunoașterea limfocitelor T prin calea directă, indirectă și semi-directă; activarea limfocitelor B și transformarea lor în plasmocite producătoare de anticorpi anti HLA și non-HLA) și relevanța lor în supraviețuirea grefelor renale. Totodată au fost prezentate și clasele de imunopresoare administrate pacienților post-transplant renal din România precum și tipurile de rejet care pot apărea post-transplant renal conform clasificării Banff.

Obiectivul major (relevanța clinică a anticorpilor anti HLA) și o serie de obiective specifice (asocierea nivelului imunopresorului de tip tacrolimus cu apariția anticorpilor anti HLA, legătura dintre epitopi sau CREGs și anticorpii anti HLA, legătura dintre anticorpii anti HLA și supraviețuirea grefei la 5 ani și identificarea genelor HLA asociate cu riscul de boală renală cronică) au fost stabilite.

În funcție de obiectivele propuse partea specială a fost structurată în 2 studii.

În cadrul primului studiu au fost evaluate prezența anticorpilor anti HLA pre- și post-transplant, dinamica evoluției, precum și efectele prezentei acestora la 347 de pacienți care au efectuat o procedură de transplant renal în cadrul unui singur centru de transplant.

Prezența anticorpilor anti HLA preformați și de novo a fost analizată retrospectiv în probele de ser înainte de transplant și la 1 până la 5 ani după transplant. Toți primitorii au avut un donator compatibil la nivel de gene HLA și la nivel de grup sanguin ABO. Niciunul dintre primitori nu a avut DSA preformat.

Anticorpii HLA de clasa I și clasa a II-a au fost depistați cu LABScreen Mixed™12, lot 023 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, SUA) pe FlexMap3d (Luminex Corporation, SUA). Screening-ul pozitiv a fost urmat de identificarea anticorpilor anti HLA cu kiturile

LS1A04 lot 013 (pentru clasa I) și LS2A01 lot 014 (pentru clasa a II-a) de la One Lambda (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, SUA). Atât depistarea, cât și identificarea anticorpilor HLA de clasă I și de clasă a II-a au fost efectuate respectând instrucțiunile producătorului, iar datele din probe au fost colectate cu ajutorul software-ului xPONENT versiunea 4.3 (Luminex Corporation, SUA) (Tait, 2016) și analizate cu HLA Fusion versiunea 4.3 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, SUA). Pe baza unei valori limită a intensității medii a fluorescenței de 1500, un anticorp anti HLA a fost considerat pozitiv sau negativ. Anticorpul anti HLA identificați au fost apoi comparați cu HLA al donatorului, ceea ce ne-a permis să identificăm DSA (adică anticorpi specifici donatorului) și non-DSA (adică anticorpi nespecifici donatorului). De asemenea, am putut preciza dacă anticorpul anti HLA identificați au fost preformați (formați înainte de orice transplant de rinichi) sau de novo (apăruți după un transplant de rinichi). Pentru variabilele categorice și continue, s-a utilizat testul Fisher exact sau testul Chi pătrat pentru a compara caracteristicile pacienților cu transplant renal în grupuri diferențiate prin prezența sau absența anticorpilor anti HLA pretransplant. Corecția Bonferroni a fost, de asemenea, aplicată în cazul analizei multivariate.

Nivelurile de tacrolimus din sânge au fost determinate cu ajutorul kiturilor Tacrolimus Reagent și a unui imunodozator cu microparticule magnetice chemiluminescente (Architect i2000, Abbot).

Variabilitatea nivelului sanguin al tacrolimusului a fost estimată prin calcularea CV-ului folosind următoarea ecuație: $CV (\%) = (\text{deviația standard}/\text{concentrația medie}) \times 100$ (Mo et al., 2019). Valorile limită pentru nivelul minim al variabilității intra-pacient al tacrolimusului la 1 până la 5 ani după transplant pentru prezicerea producerii de anticorpi anti HLA au fost determinate cu ajutorul analizei curbei operaționale a receptorului (ROC).

Rejeturile acută sau cronică a grefei au fost identificate prin biopsii renale care au fost analizate pe baza criteriilor Banff (Roufosse et al., 2018). Datele privind supraviețuirea transplantului au fost înregistrate și stocate până la momentul pierderii grefei. Analiza Kaplan Meier a fost utilizată pentru a reprezenta grafic ratele de supraviețuire a grefelor renale, iar testul log-rank a fost utilizat pentru a compara grupurile. $p < .05$ a fost considerat semnificativ din punct de vedere statistic.

La 5 ani după transplant, 48 (15%) pacienți cu transplant renal au prezentat anticorpi anti HLA de novo, procentul de pacienți imunizați post transplant renal fiind comparabil cu

cel raportat de Terasaki și Ozawa (Terasaki and Ozawa, 2004). Douăzeci și doi (6,87%) de pacienți aveau anticorpi anti HLA de novo de clasa I. Anticorpilor anti HLA de novo clasa II au fost observați la 37 (13,07%) pacienți.

Rejetul mediat de anticorpi a fost observată la 10 (20,83%) dintre cei 48 de pacienți din grupul cu anticorpi anti HLA de novo și la 7 (25,93%) dintre cei 27 de pacienți din grupul cu anticorpi anti HLA preexistenți. Rejetul mediat de celulele T a fost diagnosticat la 13 (48,15%) dintre cei 27 de pacienți din grupul cu anticorpi anti HLA preexistenți și la 19 (39,58%) dintre cei 48 de pacienți din grupul cu anticorpi anti HLA de novo.

A fost studiată asocierea nivelului de Tacrolimus în sânge cu producția de anticorpi HLA de novo și cu rejetul. Testul ROC a fost utilizat pentru a determina valoarea cut-off a nivelului de Tacrolimus în sânge. Doar nivelul de Tacrolimus în sânge mai mic de 4,6 ng/mL a fost asociat cu pozitivitatea anticorpilor HLA de novo. Aria de sub curba ROC (utilizată pentru a determina valorile cut-off de 4,6 ng/mL a fost de 0,85, cu un interval de încredere de 95% de la 0,80 la 0,88 și $p < 0,05$. Nivelul de Tacrolimus în sânge ($p = 0,2376$) nu a fost asociat cu rata de rejet a alogrefei.

Un alt factor de risc identificat în acest studiu doctoral este mismatch-ul la nivel de epitop HLA. Un număr mai mare de 18 mismatch-uri la nivel de epitop HLA crește riscul de apariție al anticorpilor anti HLA de novo, ceea ce va influența în mod negativ supraviețuirea grefelor renale. Numărul mismatch-urilor a fost stabilit cu ajutorul programului HLA Matchmaker (creat și dezvoltat de René Duquesnoy și echipa lui), pe baza nepotrivirilor existente la nivel de epitop între antigenele HLA ale donatorului și primitorului (Daniëls et al., 2018). Deoarece programul HLA Matchmaker permite studiul epitopilor doar pe baza unor genotipuri HLA determinate la nivel de înaltă rezoluție și pentru că în centrul nostru de transplant toți donatorii și primitorii de transplant renal sunt genotipați la nivel de joasă rezoluție, genele HLA obținute la nivel de joasă rezoluție au fost convertite în gene HLA la nivel de înaltă rezoluție pe baza frecvenței genelor HLA în populație (conform site-ului <http://www.allelefreqencies.net/>).

De asemenea, am analizat posibila asociere a vârstei donatorului, a tipului de donator și a vârstei receptorului, a anticorpilor HLA de novo cu respingerea renală în ambele grupuri. La pacienții fără sensibilizare anterioară, doar vârsta donatorului ($OR = 1,07$, $p = 0,001$) și tipul de donator = "donator cadaveric" ($p < 0,0001$) au fost asociate cu rate mai mari de

respingere a alogrefelor, în timp ce vârsta receptorului ($p= 0,048$), după aplicarea corecției Bonferroni, nu a rămas semnificativă statistic. La pacienții cu sensibilizare anterioară, doar tipul de donator= "viu" ($p<0,001$) a fost asociat cu rate mai mari de respingere a alogrefelor, în timp ce vârsta donatorului ($p=0,06$) și vârsta primitorului ($p= 0,481$) nu au influențat evoluția posttransplant a grefelor renale (Mărunțelu et al., 2022).

În grupurile de pacienți fără anticorpi anti HLA anteriori, ratele de supraviețuire a grefei renale cenzurate în funcție de pierderea grefei au fost de 95,8 % vs 98,9 % (1 an), 89,6 % vs 97,1 % (2 ani), 85,4 % vs 95,2 % (3 ani), 81,3 % vs 92,6 % (4 ani) și 77,1 % vs 90,8 % (5 ani). Rata de supraviețuire a grefei a fost semnificativ mai mică la primitorii cu anticorpi anti HLA de novo la 5 ani după transplant ($p=0,004$, hazard ratio= 4,0251) (Mărunțelu et al., 2022).

În grupurile de pacienți cu anticorpi anti HLA preformați, ratele de supraviețuire a grefei renale cenzurate la rețet au fost de 96,3% (1 an), 92,6% (2 ani), 88,9% (3 ani 77,8% (4 ani) și 74,1% (Mărunțelu et al., 2022).

Prin compararea ambele grupuri de pacienți s-a observat că a existat o diferență semnificativă între distribuțiile de supraviețuire la 5 ani după transplantul renal ($p=0,0286$) (Mărunțelu et al., 2022).

Doar 4 pacienți cu anticorpi anti HLA anteriori și 8 pacienți fără sensibilizare HLA anterioară dezvoltă anticorpi HLA specifici donatorului (DSA) după transplantul de rinichi. La pacienții noștri, între non DSA și DSA nu a existat nicio diferență semnificativă între distribuțiile de supraviețuire la 5 ani post-transplant renal ($p=0,754$) (Mărunțelu et al., 2022).

Cel de al doilea studiu s-a focalizat pe evaluarea genelor HLA asociate cu riscul dezvoltării bolii renale cronice. Pentru efectuarea studiului de asociere al genelor HLA cu insuficiență renală cronică au fost înrolați retrospectiv 2199 pacienți cu insuficiență renală cronică (cu sau fără transplant renal) împreună cu 2786 donatori sănătoși din Registrul National al Donatorilor Voluntari de Celule Stem Hematopoietice cu datele demografice (precum vârsta și sexul) și genotipurile HLA cunoscute.

Pe baza ADN-ului genomic uman extras din sânge recoltat pe Acid Etilen-Diamino-Tetra-Acetic (EDTA) cu ajutorul kitului QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen), au fost determinate genotipurile HLA clasa I (HLA-A, -B și -C) și HLA clasa II (HLA-DRB1, -

DQB1 și -DP) prin reacția de polimerizare în lanț a secvențelor specifice de primeri (PCR-SSP, joasă rezoluție), utilizând kiturile HLA-Ready Gene (Innotrain Diagnostik GmbH).

Frecvențele tuturor alelelor și genotipurilor HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 și HLA-DPB1, și datele demografice au fost analizate la pacienții cu insuficiență renală cronică și la donatorii sănătoși cu ajutorul programului Microsoft Excel din pachetul Office 365 (Microsoft).

În SPSS versiunea 21.0 (IBM) s-au efectuat testul χ^2 sau testul Fisher pentru a identifica grupurile de alele, genotipuri și haplotipuri HLA care se pot asocia cu un risc crescut de insuficiență renală cronică. Testul χ^2 a fost utilizat atunci când valoarea așteptată a fost mai mare de 5, iar testul lui Fisher a fost utilizat atunci când valoarea așteptată a fost mai mică de 5. De asemenea, au fost calculate în SPSS și rapoartele Odds ratio cu intervale de încredere de 95% (IC 95%) pentru a stabili puterea fiecărei asocieri a alelei, genotip sau haplotip studiate cu riscul de insuficiență renală cronică.

Estimarea frecvențelor haplotipurilor HLA s-a făcut utilizând algoritmul de estimare-maximizare al software-ului Arlequin 3.5 (Swiss Institute of Bioinformatics).

Pentru a evita riscul identificărilor eronate de asocieri ale alelelor, genotipurilor sau haplotipurilor cu riscul de insuficiență renală cronică, s-a aplicat formula de corecție Bonferroni pentru teste multiple pentru toate valorile $p < .050$.

Rezultatele obținute în cadrul studiului au fost similare cu cele prezentate în literatura de specialitate, dar au evidențiat și diferențe specifice pacienților cu transplant din România.

Mai mult de 59% dintre pacienți au fost bărbați, și peste 70% au avut vârsta cuprinsă între 26 și 45 de ani. Nu s-a observat nicio diferență semnificativă între pacienți și controale atunci când s-a analizat distribuția pe vârste și gen.

În fiecare grup analizat, au fost identificate 19 alele din locusul A, 29 alele din locusul B, 13 alele din locusul C, 15 alele din locusul DRB1, 5 alele din locusul DQB1 și 12 alele din locusul DPB1.

După aplicarea corecției Bonferroni, am constatat că anumite grupuri de alele HLA au fost asociate cu boală renală cronică: HLA-B*40 (OR = 1,4661, $p \leq .001$, $pc \leq .001$), HLA-C*12 (OR = 1,6966, $p \leq .001$, $pc \leq .001$), HLA-C*15 (OR = 1,8005, $p \leq .001$, $pc \leq .001$).

.001), HLA-DRB1*14 (OR = 1,2868, p = .002, pc = .04) și HLA-DPB1*02 (OR = 1,498, p = .004, pc = .048) (Mărunțelu et al., 2021).

Cercetarea doctorală a evidențiat câteva combinații de alele localizate la nivelul aceluiasi locus care au rămas sau nu au fost asociate semnificativ și pozitiv cu boală renală cronică după corecția Bonferroni: A*01,11 (OR = 1,73, p=.004, pc=.2437), A*03,32 (OR = 2,33, p=.003, pc=.2121), C*12,- (OR = 2,51, p < 0,001, pc < .001), DRB1*04,- (OR = 2,242; p=.006, pc=.7002), DRB1*04,14 (OR = 2,44; p=.004, pc=.3596) și DRB1*14,- (OR = 2,191; p=.007, pc=.042) (Mărunțelu et al., 2021).

Utilizând algoritmul de estimare-maximizare inclus în software-ul Arlequin (versiunea 3.5), am analizat toate haplotipurile formate prin combinarea a două, trei, patru, cinci sau șase dintre următoarele locusuri: HLA- A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 și -DPB1 găsite la pacienții români cu boală renală cronică. Pentru a stabili haplotipurile care au fost asociate în mod semnificativ cu boală renală cronică la pacienții noștri, s-a efectuat corecția Bonferroni prin înmulțirea valorii P obținute cu numărul de haplotipuri identificate pentru fiecare combinație de locus (de exemplu, 1000 de haplotipuri identificate pentru combinația de loci A-C): A*01-C*15 (p=.0003, pc=.030) și A*02-C*12 (p=.0005, pc=.0486) (Mărunțelu et al., 2021).

Rezultatele studiului efectuat pe genele HLA evidențiază faptul că mai multe grupuri de alele și genotipuri HLA sunt puternic asociate cu boala renală cronică în populația României.

Una din contribuțiile personale este reprezentată de identificarea unor noi factori de risc care nu mai fost descriși anterior în asociere cu apariția anticorpilor anti HLA în cazul pacienților români. Prin analiza asocierii dintre nivelul tacrolinemiei, la pacienții tratați cu tacrolimus- inhibitor de calcineurină) și apariția anticorpilor anti HLA, a fost identificat un nivel minim de 4,6 ng/ml al tacrolimusului în sânge asociat cu un risc mai mic de a dezvolta anticorpi. O altă observație importantă a fost legată de impactul semnificativ al anticorpilor anti HLA de novo în scăderea funcției grefei la 5 ani post-transplant.

Studiul nostru a demonstrat că supraviețuirea grefei la un an este de 98,5%, urmând să scadă până la aproximativ 90%. În cadrul celui de al doilea studiu s-a urmărit identificarea unor gene HLA care pot fi asociate cu un risc crescut de boală renală de greafă dar și cu o posibilă disfuncție de greafă renală. O altă contribuție personală constă în identificarea unor

gene HLA care ar putea fi asociate cu un risc crescut de apariție și progresie a insuficienței renale cronice către stadiul 5 necesitant de un mijloc de substituție a funcției renale sau chiar transplant renal. Alegerea donatorilor de rinichi care nu prezintă genele care predispun la insuficiență renală cronică ar putea îmbunătăți prognosticul grefelor renale pe termen lung ținând cont că există patologii care pot reapărea post transplant și afecta organul transplantat.

Limitările majore ale studiilor sunt reprezentate de numărul mic de pacienți și de durata redusă de urmărire. Ca urmare, modificările procedurilor de transplant și ale imunosupresiei de-a lungul timpului pot duce la o supraestimare a supraviețuirii în studiul nostru (Graham et al., 2022). Alte limitări sunt reprezentate de kiturile utilizate pentru analiza anticorpilor anti HLA, care sunt potrivite pentru identificarea proteinei țintă, dar nu au posibilitatea de a cuantifica nivelurile de anticorpi și valoarea prag MFI, care poate fi diferită de valorile utilizate în alte laboratoare. Cu toate acestea, aceasta este prima raportare a asocierii dintre terapia imunosupresoare și producerea de anticorpi anti HLA de novo după transplant și supraviețuirea grefei în populația României.

Deoarece boala renală cronică este încă o afecțiune relativ frecventă, nu este posibil să se excludă acest lucru în populația de control. Prin urmare, anumiți subiecți ar fi fost diagnosticați cu boala renală cronică pe parcursul vieții lor.

Studiile viitoare ar trebui să abordeze limitările menționate mai sus și să verifice dacă creșterea numărului de pacienți și a timpului de urmărire va confirma concluziile noastre.

Perspectivile de continuare a cercetărilor în perioada post-doctorală constau în realizarea unui studiu multicentric în care să fie incluși toți pacienții cu transplant renal. Considerăm că această cercetare ar trebui extinsă pentru a determina dacă selectarea donatorilor de rinichi fără grupuri de alele HLA sau genotipuri susceptibile la dezvoltarea insuficienței renale cronice ar putea duce la rate de supraviețuire mai mari a alogrefelor renale la pacienții noștri. Totodată, studiul epitopilor HLA pentru a determina numărul maxim de mismatch-uri asociat cu un risc scăzut de apariție a anticorpilor anti HLA de novo precum și nivelul citokinelor pro-inflamatorii la pacienți cu anticorpi pozitivi pot constitui viitoare teme de cercetare și ar permite nefrologilor să gestioneze mai bine pacienții cu transplant renal pentru a le îmbunătăți starea clinică, dar și pentru a preveni disfuncția cronică de grefă cât mai mult timp posibil.

Bibliografie-Rezumat

- Chen, T.K., Knicely, D.H., Grams, M.E., 2019. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management. *JAMA* 322, 1294–1304. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.14745>
- Daniëls, L., Naesens, M., Bosmans, J.-L., Abramowicz, D., Nagler, E., Van Laecke, S., Peeters, P., Kuypers, D., Emonds, M.-P., 2018. The clinical significance of epitope mismatch load in kidney transplantation: A multicentre study. *Transpl Immunol* 50, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2018.06.006>
- de Sousa, M.V., Gonzalez, A.C., Zollner, R. de L., Mazzali, M., 2018. Effect of Preformed or De Novo Anti HLA Antibodies on Function and Graft Survival in Kidney Transplant Recipients. *Ann Transplant* 23, 457–466. <https://doi.org/10.12659/AOT.908491>
- Fountain, J.H., Lappin, S.L., 2022. Physiology, Renin Angiotensin System, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Graham, C.N., Watson, C., Barlev, A., Stevenson, M., Dharnidharka, V.R., 2022. Mean lifetime survival estimates following solid organ transplantation in the US and UK. *J Med Econ* 25, 230–237. <https://doi.org/10.1080/13696998.2022.2033050>
- Halloran, P.F., Reeve, J.P., Pereira, A.B., Hidalgo, L.G., Famulski, K.S., 2014. Antibody-mediated rejection, T cell-mediated rejection, and the injury-repair response: new insights from the Genome Canada studies of kidney transplant biopsies. *Kidney Int* 85, 258–264. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.300>
- Hussain, Y., Khan, H., 2021. Immunosuppressive Drugs. Reference Module in Biomedical Sciences B978-0-12-818731-9.00068-9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00068-9>
- Kalluri, H.V., Hardinger, K.L., 2012. Current state of renal transplant immunosuppression: Present and future. *World J Transplant* 2, 51–68. <https://doi.org/10.5500/wjt.v2.i4.51>

- Kang, S.K., Park, S.K., 1987. Nephrotic Syndrome Associated with Renal Vein Thrombosis. *Korean J Intern Med* 2, 125–130.
<https://doi.org/10.3904/kjim.1987.2.1.125>
- Levin, A., Stevens, P.E., 2014. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int* 85, 49–61. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.444>
- Lin, J.S., Susztak, K., 2016. Podocytes: The Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? *Curr Diab Rep* 16, 45. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0735-5>
- Mărunțelu, I., Cristea, B.M., Omer, S., Preda, C.M., Constantinescu, I., 2021.** Relevance of HLA gene polymorphisms in Romanian patients with chronic renal insufficiency undergoing renal transplantation. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 35, e24075. <https://doi.org/10.1002/jcla.24075>
- Mărunțelu, I., Nistor, C.E., Cristea, B.M., Rotarescu, C.A., Caragea, A.M., Tizu, M., Constantinescu, I., 2022.** Retrospective Study from a Single Center in Romania of 347 Renal Transplant Patients Treated with Tacrolimus, Mycophenolate, and Steroids to Evaluate the Association Between Anti HLA Antibodies and 5-Year Graft Survival. *Ann Transplant* 27. <https://doi.org/10.12659/AOT.937267>
- Mo, H., Kim, S.-Y., Min, S., Han, A., Ahn, S., Min, S.-K., Lee, H., Ahn, C., Kim, Y., Ha, J., 2019. Association of Inpatient Variability of Tacrolimus Concentration With Early Deterioration of Chronic Histologic Lesions in Kidney Transplantation. *Transplant Direct* 5, e455. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000899>
- Phillpott, M., Daga, S., Higgins, R., Lowe, D., Krishnan, N., Zehnder, D., Briggs, D., Khovanova, N., 2022. Dynamic Behaviour of Donor Specific Antibodies in the Early Period Following HLA Incompatible Kidney Transplantation. *Transpl Int* 35, 10128. <https://doi.org/10.3389/ti.2022.10128>
- Pourghasem, M., Shafi, H., Babazadeh, Z., 2015. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy. *Caspian J Intern Med* 6, 120–127.

- Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Jr, H.W.S., Frew, A.J., Weyand, C.M., 2012. Clinical Immunology E-Book: Principles and Practice. Elsevier Health Sciences.
- Roufosse, C., Simmonds, N., Clahsen-van Groningen, M., Haas, M., Henriksen, K.J., Horsfield, C., Loupy, A., Mengel, M., Perkowska-Ptasińska, A., Rabant, M., et al., 2018. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation* 102, 1795–1814. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002366>
- Statistici anuale, n.d. . Agentia Nationala de Transplant. URL <http://transplant.ro/statistici-anuale/> (accessed 9.4.22).
- Stompór, T., Perkowska-Ptasińska, A., 2020. Hypertensive kidney disease: a true epidemic or rare disease? *Pol Arch Intern Med* 130, 130–139. <https://doi.org/10.20452/pamw.15150>
- Tait, B.D., 2016. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Front Immunol* 7, 570. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00570>
- Terasaki, P.I., Ozawa, M., 2004. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 4, 438–443. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00360.x>
- Tonelli, M., Wiebe, N., Knoll, G., Bello, A., Browne, S., Jadhav, D., Klarenbach, S., Gill, J., 2011. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes, Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE): Quality-assessed Reviews [Internet]. Centre for Reviews and Dissemination (UK).
- Toth-Manikowski, S., Atta, M.G., 2015. Diabetic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets. *J Diabetes Res* 2015, 697010. <https://doi.org/10.1155/2015/697010>
- Vallon, V., Komers, R., 2011. Pathophysiology of the Diabetic Kidney. *Compr Physiol* 1, 1175–1232. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100049>

- Volodarskiy, A., Kumar, S., Amin, S., Bangalore, S., 2016. Optimal Treatment Strategies in Patients with Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Disease. *Am J Med* 129, 1288–1298. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.06.046>
- Warady, B.A., Chadha, V., 2007. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatr Nephrol* 22, 1999–2009. <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0410-1>
- Zecher, D., Bach, C., Staudner, C., Böger, C.A., Bergler, T., Banas, B., Spriewald, B.M., 2017. Characteristics of donor-specific anti HLA antibodies and outcome in renal transplant patients treated with a standardized induction regimen. *Nephrol Dial Transplant* 32, 730–737. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw445>
- Zhang, R., 2018. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 13, 182–192. <https://doi.org/10.2215/CJN.00700117>