

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA” BUCUREȘTI
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT
TOLERANȚA IMUNOLOGICĂ ÎN TRANSPLANTUL DE ȚESUTURI COMPOZITE

Conducător științific:

Prof. Emerit Dr. IOAN LASCĂR

Doctorand:

ANDREEA GROSU-BULARDA

București

2016

Cuprins rezumat

Partea generală	1
1. Introducere	1
2. Definiții	2
3. Istoric	3
4. Statusul curent al VCA	3
5. Imunologia transplantului alogrefelor vascularizate compozite	4
6. Imunosupresia în Transplantul Alogrefelor Vascularizate Compozite	5
Particularitățile tratamentului imunosupresor în transplantul alogrefelor vascularizate compozite	5
7. Toleranța imunologică în transplantul alogrefelor vascularizate compozite	6
Partea Specială	8
8. Justificarea studiului doctoral	8
9. Abordarea problematicii imunologice în alotransplantul vascularizat compozit	9
9.1. Influențarea sistemului imun în alotransplant: balanța toleranța-rejecție	9
9.2. Abordare conceptuală personală:	11
Analiza multiplilor factori implicați în influențarea răspunsului imun în alotransplantul vascularizat compozit și posibilitatea direcționării acestora către acceptarea alogrefelor	11
10. Analiza factorilor ce influențează direcționarea răspunsului imun în VCA	13
10.1. Programul de transplant tisular compozit ca factor determinant al rezultatelor funcționale și imunologice în VCA: rolul chirurgului plastician	13
10.2. Selecția pacienților în vederea reconstrucției utilizând alotransplantul vascularizat compozit	14
Propunere protocol general de selecție în alotransplantul vascularizat compozit	14
Evaluarea pacienților arși ca potențiali candidați pentru reconstrucția utilizând alotransplantul vascularizat compozit: considerente clinice și imunologice	16
10.3. Propunere protocol de testare imunologică	20
10.4. Propunere protocol de evaluare a infecțiilor în alotransplantul vascular compozit	20
10.5. Intervenția chirurgicală de transplant vascularizat compozit și urmărirea postoperatorie a pacienților: influențe asupra rezultatelor funcționale și aspectelor imunologice	22
10.5.1. Prezentare generală	22
10.5.2. Contribuții personale în pregătirea în vederea efectuării procedurilor de alotransplant vascularizat compozit	22
10.5.3. Studiu Imagistic: Evaluarea Vascularizației Arteriale a Peretelui Abdominal Inferior Folosind Angio-Computer Tomografia. Potențialul aplicării în alotransplantul vascularizat compozit	23
10.5.4. Evaluarea peretelui abdominal inferior prin Angio-RMN: caz clinic	30
10.5.5. Studiu anatomo-chirurgical la cadavru proaspăt asupra peretelui abdominal inferior	30

10.5.6. Discutii.....	31
10.6. Protocol de monitorizare a rejecției în alotransplantul vascularizat compozit.....	33
Propunere strategie de monitorizare a rejetului în alotransplantul vascularizat compozit.....	34
10.7. Propunere Protocol Terapeutic Imunosupresor în Alotransplantul Vascularizat Compozit	36
11. Strategii pro-tolerogenice in alotransplantul vascularizat compozit	38
11.1. Prezentarea activității experimentale: studii imunologice în alotransplantul vascularizat compozit	38
11.1.1. Introducere	38
11.1.2. Direcții abordate.....	39
11.2. Dezvoltarea unui model animal adecvat pentru studii imunologice	39
Material si metoda.....	39
Rezultate	40
Discutii.....	42
11.3. Evaluarea dinamicii rejecției în modelul experimental de alotransplant ortotopic de membru pelvin la șobolan	42
11.4. Transplantul de maduvă osoasă vascularizată(VBMT) și chimerismul hematopoietic: studii experimentale.....	43
11.4.1. Transplantul măduvei vascularizate ca alternativă la transplantul celular convențional de maduvă osoasă	43
11.4.2. Transplantul măduvei vascularizate ca strategie de inducere a toleranței imunologice în alotransplantul vascularizat compozit	45
11.5. Alotransplantul vascularizat de creastă iliacă: studiu preliminar anatomo-chirurgical	50
11.5.1. Introducere	50
11.5.2. Propunere protocol chirurgical de prelevare a lamboului vascularizat de creastă iliacă pentru utilizare în procedee de alotransplant.....	50
11.5.3. Discuții.....	51
11.6. Rolul imunomodulator al celulelor stem mezenchimale umane provenite din țesutul adipos: studii preliminare	52
11.7. Plasma îmbogățită cu trombocite(PRP) ca strategie imunomodulatorie.....	54
11.8. Alotransplantul de trahee: studii preliminare.....	54
Protocol chirurgical de alotransplant de trahee: studiu chirurgical la cadavru proaspăt.....	54
Studiu experimental preliminar în aloransplantul de trahee.....	57
Discuții.....	58
12. Discutii finale.....	59
Concluzii	73

Bibliografie 80

Partea generală

1. Introducere

Începând cu anul 1954 când a fost efectuat primul transplant renal reușit, de către Joseph Murray, utilizarea organelor umane pentru transplanturi s-a intensificat în mod constant în cursul ultimelor decenii, medicina de transplant având o dezvoltare uimitoare și un mare potențial terapeutic. În prezent, intervențiile de transplant sunt efectuate cu succes în clinici specializate din întreaga lume: selecția pacienților, protocoalele chirurgicale, managementul pre-și post-operator și terapia imunosupresoare fiind deja standardizate.[1,2]

Recent a apărut o nouă entitate terapeutică: chirurgia reconstructivă de transplant, ce presupune transplantul alogrefelor vascularizate compozite-fiind unica soluție terapeutică în cazul anumitor defecte tisulare complexe, implicând multiple structuri cu importanță funcțională, imposibil de reparat utilizând tehnicile chirurgicale convenționale.[3-5]

După anul 1998, când a fost efectuat primul transplant de mână în Franța, la Lyon, s-a produs o dezvoltare neașteptată a chirurgiei reconstructive de transplant, până în prezent fiind efectuate la nivel mondial peste 200 astfel de proceduri, cu numeroase aplicații clinice: membru toracic, membru pelvin, laringe, uter, tendoane, perete abdominal, nervi, față, limbă, scalp. Ceea ce caracterizează alogrefele de țesuturi compozite este complexitatea, determinată de heterogenitatea lor histologică, cuprinzând multiple tipuri tisulare (piele, grăsime, mușchi, nervi, ganglioni limfatici, os, măduvă osoasă, cartilaj, ligamente) fiecare exprimând un grad diferit de imunogenicitate. [3, 6-9]

Deși nu reprezintă o intervenție indispensabilă supraviețuirii, precum transplantul de organe solide, atenția societății a fost îndreptată spre transplantul vascular compozit datorită potențialului de a reinstaura calitatea vieții primitorilor unui astfel de transplant: în general candidații pentru o astfel de procedură prezintă defecte extensive, mutilante fizic și stigmatizante social, parcurgând un lung șir de intervenții chirurgicale laborioase în scop reconstructiv în urma cărora rezultatul funcțional și estetic nu este satisfăcător, cu afectare psihologică și socio-profesională. [8-10]

Având o experiență clinică de aproape două decenii, cu standardizarea indicațiilor și protocoalelor chirurgicale, singurele limitări în ceea ce privește utilizarea pe scară largă a alogrefelor vascularizate compozite sunt aspectele imunologice: fiind proceduri non-vitale devine discutabilă expunerea pacienților la terapie imunosupresoare pentru tot restul vieții, cu efectele adverse legate de administrarea acesteia.[3, 8, 10,11].

În prezent principala direcție de cercetare în transplantul tisular compozit este în domeniul imunologic. Orientarea este spre minimizarea imunosupresiei pentru a se asigura funcționalitatea alogrefei cu minime efecte adverse. Idealul este inducerea toleranței imune donor-specifice: lipsa specifică de reacție față de antigenele donorului, în absența terapiei imunosupresoare, restul sistemului imun fiind intact, putând răspunde la contactul cu alt tip de antigene. Dezideratul este reprezentat de toleranța “adeverată”, completă, cu acceptarea alogrefei, fără a necesita terapie imunosupresoare, situație ideală dar greu de obținut în practica clinică. Toleranța parțială

reprezintă o viziune mai realistă : posibilitatea inducerii unui grad de toleranță ce permite diminuarea semnificativă a dozelor de imunosupresoare și a reacțiilor adverse secundare acestei terapii, promulgând extinderea utilizării transplanturilor vascularizate compozite, datorită înaltului potențial reconstructiv al acestora. [11-13]

2. Definiții

Transplantul alogrefelor vascularizate compozite reprezintă transplantul unei unități structurale, funcționale și estetice neurovascularizate, conținând o asociere de țesuturi nonvitale, cu originea în straturi germinative diferite: ectodermală - epidermul și derivatele sale (păr, glande sebacee și sudoripare, unghii), nervii și mezodermală - dermul, țesutul celular subcutanat, mușchi, tendoane, fascii, cartilaje, oase, vase de sânge).[14, 15]

Aplicațiile clinice descrise ale alotransplanturilor vascularizate compozite sunt: membru toracic, membru pelvin, genunchi vascularizat, față, laringe, trahee, perete abdominal, uter, penis. [3]

În SUA, printr-o decizie intrată în vigoare în data de 3 iulie 2014, alogrefele vascularizate compozite (VCA) sunt adăugate în definiția organelor conform reglementărilor federale(Regulamentul Final al OPTN-Organ Procurement and Transplantation Network/Rețeaua de Procurare și Transplant de Organe) și legislației în vigoare.(National Organ Transplant Act). [16]

Criteriile OPTN de definire a alotransplanturilor vascularizate compozite(VCA)[16]:
--

1. Sunt alogrefe vascularizate și necesită anastomoze vasculare chirurgicale pentru a putea funcționa

2. Conțin multiple tipuri de țesuturi

3. Prelevate de la donator uman ca unitate anatomică/structurală
--

4. Transplantate la primitor uman ca unitate anatomică/structurală
--

5. Implică manipulare minimă(procesare ce nu alterează caracteristicile originale relevante ale organului în relație cu utilitatea organului pentru reconstrucție, reparare sau substituție)
--

6.Utilizare pentru funcție omoloagă celei inițiale(înlocuirea sau îmbunătățirea organului primitorului cu un organ similar ce efectuează aceleași funcții de bază atât la donator cât și la primitor)

7. Nu sunt combinate cu un alt articol, precum diferite dispozitive

8. Sunt susceptibile la ischemie, fiind posibilă doar stocarea temporară nu și crioprezervarea
--

9. Prezintă susceptibilitate de rejecție a alogrefei, impunând administrarea terapiei imunosupresoare ce poate crește riscul de apariție a bolilor infecțioase la primitor.

Momentan în domeniul VCA nu a fost adoptat un set de reglementări valabile la nivel mondial, singura bază de date multinațională existentă în domeniu fiind Registrul Internațional de Transplant de Mână și Țesuturi Compozite(International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation:IRHCTT), registru de mare importanță în evaluarea globală a transplanturilor tisulare compozite, însă înregistrarea cazurilor fiind voluntară, în prezent acesta nu conține un set de date complet.[17, 18]

3. Istoric

Pentru a se ajunge la realitatea clinică a efectuării transplanturilor vascularizate compozite, au fost necesare milenii de cunoaștere, astfel de intervenții impunând cele mai înalte standarde medicale și chirurgicale. Medicina reconstructivă de transplant este un domeniu extrem de complex, pentru dezvoltarea sa impunându-se cumularea progreselor efectuate în ceea ce privește procedeele reconstructive microchirurgicale și transplantologie (aspecte tehnice și imunologice), cât și crearea unui cadru etic, legal și social favorabil. Au fost prezentate în cadrul acestui capitol momentele esențiale ce au dus la apariția VCA ca și realitate clinică.

4. Statusul curent al VCA

Evoluția științei în transplantul de organe solide și dezvoltarea procedurilor chirurgicale reconstructive au permis dezvoltarea chirurgiei reconstructive de transplant, ce integrează cunoașterea actuală din domeniul medicinei de transplant cu procedeele reparatorii extrem de complexe.[2, 19]

Transplanturile tisulare compozite au o serie de caracteristici comune cu transplantul de organe solide: ambele sunt alogrefe vascularizate, recuperate de la donatori umani ca și unitate anatomică/structurală, fiind apoi transplantate la primitori umani, ce au apoi nevoie de terapie imunosupresoare pentru a evita rejecția alogrefelor și pierderea acestora. În același timp, VCA-urile sunt diferite de transplantul de organe solide prin faptul că sunt în principal externe, vizibile, constituite din țesuturi cu originea în diferite straturi germinative, iar regenerarea nervoasă este obligatorie pentru asigurarea funcției alogrefei.[19-21]

Cele trei provocări principale în acest domeniu al transplantului sunt următoarele:

1. Imunologică: având în structura unei alogrefe VCA mai multe tipuri de țesuturi cu încărcături antigenice diferite, incluzând pielea, ce este un țesut extrem de antigenic;
2. Tehnică: complexitatea procedurilor și durata mare a intervențiilor mai ales în transplantul de față, necesitatea unui sistem bine coordonat și a unei echipe multidisciplinare, succesul VCA bazându-se pe o bună funcționalitate, care depinde de calitatea operației, regenerarea nervoasă, programul de recuperare și reorganizarea corticală adecvată;
3. Psiho-socială pentru importanța redobândirii funcției pierdute și a aspectului estetic și capacitatea beneficiarilor de un transplant compozit de a accepta alogrefa și a integra țesuturile vizibile transplantate în propria lor imagine. De asemenea un aspect major este redobândirea calității vieții și posibilitatea reinsertiei socio-profesionale în urma transplantului.[19]

Deși nu există o cazuistică clinică la fel de extinsă ca în alte ramuri chirurgicale, s-a observat un progres considerabil în acest domeniu și tendința de transformare a alotransplanturilor vascularizate compozite din proceduri experimentale în standard de îngrijire al pacienților cu defecte complexe, extensive. [2, 19]

Am prezentat în detaliu, în cadrul capitolului, cazuistica internațională pentru principalele tipuri de alogrefe compozite.

5. Imunologia transplantului alogrefelor vascularizate compozite

Spre deosebire de transplantul de organe când alogrefa are o compoziție histologică uniformă, alogrefele din transplanturile vascularizate compozite au în componența lor un spectru larg de țesuturi incluzând piele, țesut subcutanat, mușchi, nervi, tendoane, os, cartilaj, vase de sânge, fiecare dintre aceste structuri având un potențial imunologic diferit.[22] Joseph Murray a prezentat o scală relativă antigenicității organelor și țesuturilor, pielea și plămânul fiind cele mai antigenice structuri.[23]

În cazul transplanturilor tisulare compozite s-au observat aspecte mai complexe legate de interacțiune antigenică a componentelor acestora. Două dintre componentele VCA sunt intens studiate datorită țintirii lor preponderente în răspunsul imun: componenta tegumenară, ce este intens imunogenică și reprezintă ținta principală a rejecției mediate prin răspunsul imun celular ce implică activarea limfocitelor T și vasele sangvine ce sunt afectate prin mecanisme de răspuns imun umoral, ducând în timp la rejecție cronică similar situației întâlnite în transplantul de organe.[24]

Rejecția alogrefelor în transplant este un proces complex, la care contribuie atât imunitatea celulară cât și umorală.

În linii mari, răspunsul imun celular la alogrefa implică limfocitele T aloreactive CD4+ și citotoxice CD8+ ce sunt activate de către celulele dendritice de la donator la nivelul organelor limfoide secundare. Aceasta activare determină proliferarea clonelor donor-specifice, capabile să recunoască moleculele HLA provenite de la alogrefă. Ulterior limfocitele T CD8+ migrează la nivelul grefei determinând distrucția prin liza celulară mediată de molecule ca perforina sau granzimele. Biopsiile prelevate de la alogrefele ce prezintă rejecție au arătat prezența infiltratului celular limfocitar CD4+ și CD8+ și de asemenea prezența altor tipuri celulare(monocite, macrofage și neutrofile) ce sunt implicate în răspunsurile inflamatorii non-specifice. [24]

Răspunsul imun umoral este mediat de anticorpii anti-HLA donor specifici(DSA-donor specific anti-HLA antibodies). Anticorpii se leagă de suprafața celulelor endoteliale de la nivelul alogrefei și determină afectare endotelială și disfuncția grefei prin calea clasică de activare a complementului și recrutarea celulelor imune aparținând imunității înăscute(citotoxicitate dependentă de anticorpi), ducând la rejecție acută mediată umoral. În situația în care nu se produce activarea complementului, se pot produce lent, în timp leziuni mediate de anticorpi la nivelul alogrefei ducând la rejecția cronică, ilustrată de apariția vasculopatiei la nivelul alogrefei. Componenta umorală a răspunsului imun este considerată ca fiind cauza primară de pierdere la distanță(după timp îndelungat), a alogrefelor renale. [24]

Mecanismele descrise se regăsesc și în ceea ce privește transplantul de țesuturi compozite, cu mențiunea că rolul major în rejecția alogrefelor VCA aparține răspunsului imun celular. S-a observat și implicarea mecanismelor umorale în deteriorarea alogrefelor compozite de mână și față, însă incidența acestor afectări și mecanismele clare de apariție a lor sunt încă în curs de cercetare.[22]

Au fost detaliate în cadrul capitolului mecanismele moleculare ale rejecției, cât și particularitățile dinamicii rejecției.

Modalitățile de prevenire a rejecției în transplant sunt reprezentate de:

- Imunosupresie/imunomodulare
- Toleranța imunologică, ce reprezintă “standardul de aur” în alotransplant.

Mecanismele moleculare ce stau la baza acestor strategii de prevenire a rejetului în alotransplant, cât și experiența curentă în domeniul alotransplantului vascularizat compozit sunt prezentate în detaliu în următoarele două capitole ale tezei.

6. Imunosupresia în Transplantul Alogrefelor Vascularizate Compozite

Imunosupresoarele utilizate în transplantul alogrefelor vascularizate compozite sunt aceleași ca în cazul transplanturilor de organe, schemele terapeutice prezentând anumite particularități în funcție de tipul de transplant. [25]

Pierderea alogrefelor cauzată de factori imunologici s-a dovedit ca fiind cea mai ridicată în primele luni după transplant, astfel că există variații în ceea ce privește dozele terapeutice imunosupresoare. Se pot distinge 3 perioade de administrare a terapiei imunosupresoare:

1. Perioada de inducție
2. Perioada de menținere inițială (precoce)
3. Perioada de menținere cronică

Episoadele de rejet beneficiază de tratament specific, mai agresiv, considerat "terapie de salvare". Atât în cazul transplantului de organe cât și a celor compozite, prima linie de tratament în episoadele de rejecție acută este reprezentată de creșterea dozelor de glucocorticoizi, concomitent cu optimizarea nivelurilor bazale de imunosupresie. Când această strategie eșuează, se pot administra anticorpi intravenos. În cazul transplanturilor de mână și de față, agenți topici ca steroizi sau tacrolimus, pot constitui o soluție în controlul local al episodului de rejet limitat la nivelul pielii. [26]

Agenții imunosupresori utilizați în practica clinică din transplant pot fi încadrați în două tipuri: farmacologici și biologici, prezentați în detaliu în cadrul capitolului.

Particularitățile tratamentului imunosupresor în transplantul alogrefelor vascularizate compozite

În ceea ce privește agenții imunosupresori utilizați, protocoalele în transplanturile tisulare compozite sunt similare celor din transplantul de organe, în special schemelor utilizate pentru transplanturile de rinichi, cord sau pancreas (ficatul este mai bine tolerat ca organ, necesită regimuri imunosupresoare mai blânde). Schemele utilizate previn pierderea alogrefei, însă nu reușesc să prevină apariția episoadelor de rejecție acută în VCA (85-90% din primitorii de transplant de mână prezintă episoade de rejecție acută în primul an post-transplant).

Tabelul următor redă agenții imunosupresori utilizați în transplanturile de mână și față, sumarizând experiența globală [27]:

Faza terapiei imunosupresoare	Agenți utilizați și proporția de cazuri în care se utilizează agentul terapeutic	
	Transplantul de mână	Transplantul de față
Terapia de inducție	Alemtuzumab (56%)	Alemtuzumab (17%)

	ATG(28%) Basiliximab(16%)	ATG(70%) Basiliximab(13%)
Terapia de menținere	Tacrolimus+MMF+Steroizi(79%) Tacrolimus+Steroizi(6%) Inhibitor mTOR+MMF(5%) Inhibitor mTOR (5%) Tacrolimus+Steroizi topici(5%)	
Tratamentul episoadelor de rejet acut	Corticoizi administrați intravenos(60%) Corticoizi administrați oral(30%) Basiliximab, ATG, Alemtuzumab(7.5%) Doar topice locale(2.5%)	

Tripla terapie, cu administrarea tacrolimus, MMF și steroizi este protocolul standard de imunosupresie de menținere. Unele centre încearcă reducerea dozelor de steroizi, sau chiar eliminarea lor din schema terapeutică. Pentru evitarea efectelor adverse ale inhibitorilor de calcineurină, tendința este includerea inhibitorilor mTOR în terapia de menținere, ca înlocuitor al Tacrolimus[27].

În transplanturile ce au și componentă tegumentară, s-au utilizat și preparate topice pentru controlul episoadelor de rejecție, în cazurile ușoare chiar fără a fi necesară creșterea în intensitate a terapiei imunosupresoare sistemice. Topicele folosite sunt compuși steroidici și Tacrolimus.[26]

Am urmărit protocoalele imunosupresoare utilizate în centrele mari de transplant tisular compozit, prezentând comparativ aceste scheme terapeutice.

7. Toleranța imunologică în transplantul alogrefelor vascularizate compozite

Progresele recente în domeniul imunologiei transplantului au modificat focusul dinspre imunosupresie către imunomodulare, făcând posibil transplantarea cu succes a alogrefelor vascularizate compozite în prezența unor regimuri imunosupresoare noi, mai puțin agresive.[28]

Pe termen lung, scopul este inducerea toleranței donor-specifice în transplant pentru a nu a mai fi nevoie să se administreze medicație imunosupresoare, toxicitatea acesteia determinând multiple complicații post-transplant. Obținerea toleranței imunologice a fost asimilată conceptului "Sfântului Graal", reprezentând reușita ideală, supremă în domeniul transplantului: acceptarea alogrefei fără a se impune supresarea întregului sistem imun și povara reprezentată de terapia imunosupresoare pe întreaga durată a vieții pacientului. [29]

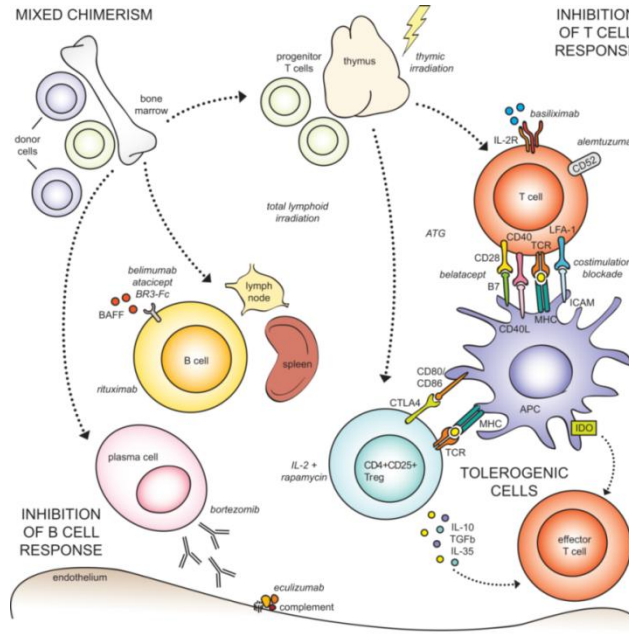
Cercetarea actuală se orientează către obținerea unor protocoale simple, sigure și durabile de inducere a toleranței imune la primitorii transplanturilor vascularizate compozite, pentru a extinde accesibilitatea către aceste metode terapeutice.

Până în prezent au fost testate multiple protocoale experimentale de inducere a toleranței imunologice, bazate pe diferite căi de acțiune, o parte dintre acestea regăsindu-se deja în practica clinică.

Tabelul următor prezintă metodele de inducere a toleranței imunologice studiate în transplantul vascularizat compozit, listate cronologic[12], strategii ce au fost detaliate atent în cursul acestui capitol al tezei de doctorat.

Metoda	Calea de inducție
Chimerismul	Transplantul de măduvă osoasă hematogenă, Transplantul de măduvă vascularizată
Depleția celulelor T	ATG, OKT3 mAb, Campath-1H (CD52) mAb, $\alpha\beta$ TCR/ $\gamma\delta$ TCR mAb
Blocada costimulatoare	CD154, CD28, și/sau CD40 mAbs, ligandul B7, CTLA-4 Ig (proteina de fuziune)
Celulele dendritice ale donorului	Manipularea in vitro urmată de infuzia intravenoasă
Celule stem mezenchimale	Expansiune ex vivo urmată de infuzia intravenoasă
Celule T reglatoare	Inducția in vivo urmată de infuzia intravenoasă

Imaginea următoare prezintă principalele mecanisme și interacțiuni celulare ce duc la instalarea toleranței imunologice post-transplant[30]:



(Page EK, Dar WA, Knechtle SJ. Tolerogenic therapies in transplantation. *Frontiers in Immunology*. 2012;3:198, Licență Creative Commons Attribution 3.0 Unported License)

Partea Specială

8. Justificarea studiului doctoral

Transplantul alogrefelor vascularizate compozite este un domeniu clinic recent, cu o vechime de mai puțin de două decenii, ce pare, prin prisma rezultatelor obținute, să prezinte un potențial reconstructiv deosebit. Fiind însă o subspecialitate nouă, sunt esențiale susținerea cercetării translaționale în acest domeniu și crearea unui cadru instituțional internațional comun, în vederea standardizării indicațiilor acestor proceduri și protocoalelor terapeutice utilizate.

În România nu au fost efectuate până în prezent proceduri clinice de alotransplant de țesuturi compozite. În cadrul Clinicii de Chirurgie Plastică, Estetica și Microchirurgie Reconstructivă a Spitalului Clinic de Urgență București au fost puse bazele unui program de transplant tisular compozit, prin cercetarea experimentală susținută și pregătirea translației către practica clinică.

Există o serie de factori ce influențează succesul unui transplant vascular compozit: instituție acreditată, experiență chirurgicală de nivel înalt, echipă multidisciplinară, selecția riguroasă a pacienților, protocoale bine stabilite, program de urmărire pe termen lung a pacienților. Parcurgerea fiecărei etape fiind obligatorie, experiența la nivel mondial reprezintă un punct de plecare în elaborarea unor protocoale optime de lucru, pentru a implementa această nouă ramură chirurgicală ce oferă posibilități reconstructive deosebite pentru pacienții cu defecte tisulare extensive ce nu pot fi rezolvați cu ajutorul procedurilor chirurgicale convenționale.

În prezent, principala direcție de cercetare în medicina reconstructivă de transplant este în domeniul imunologic. O bună înțelegere a imunobiologiei transplantului este crucială, fiecare mic detaliu ce influențează răspunsul imun putând afecta rezultatul final în transplant.

În acest context, am urmărit alinierea cercetării cu cea de pe plan internațional, aprofundarea cunoașterii în domeniul alotransplantului vascular compozit prin intermediul cercetării experimentale și crearea unui cadru favorabil pentru translația experienței acumulate către clinic, cu scopul de a implementa un program multidisciplinar de transplant vascularizat compozit.

În cadrul tezei de doctorat, interesul este asupra problemelor imunologice observate în transplantul vascularizat compozit, vizând:

- identificarea și posibila dirijare în sens favorabil(către acceptarea alogrefei) a situațiilor ce influențează răspunsul imun,
- o bună înțelegere a dinamicii rejecției și posibilităților terapeutice specifice antirejet,
- obiectivul major este dezvoltarea, testarea și implementarea unor protocoale de inducere a toleranței imunologice(chiar și a toleranței parțiale), cu scopul reducerii necesității administrării terapiei imunosupresoare și implicit a toxicității asociate acesteia, promulgând utilizarea transplanturilor vascularizate compozite, datorită înaltului potențial reconstructiv al acestora.

Problematika propusă în prezenta lucrare este inovativă, de extrem de mare actualitate internațională, are caracter interdisciplinar, integrând concepte din cadrul cercetării fundamentale, terapiilor celulare și regenerative, imunobiologiei și aplicându-le în beneficiul medicinei de transplant, tinzând astfel spre conceptul modern al cercetării translaționale.

Rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat, atât în urma studiilor experimentale efectuate cât și a protocoalelor clinice testate ca etape preliminare în dezvoltarea programului clinic de transplant de alogrefe vascularizate compozite, vor facilita implementarea acestei noi strategii terapeutice, recunoscută ca ultimă soluție reconstructivă în cazul pacienților cu defecte tisulare complexe, extensive.

Abordarea unui subiect încă în curs de cercetare susținută în cadrul marilor centre de transplant la nivel mondial, necesitând condiții deosebite și adresabilitate multidisciplinară, asigură îmbunătățirea nivelului de cunoaștere al echipei, furnizează experiența necesară dezvoltării pe viitor a unor proiecte de cercetare noi, la nivel național și chiar internațional, promovând colaborarea cu instituții similare.

9. Abordarea problematicii imunologice în alotransplantul vascularizat compozit

9.1. Influențarea sistemului imun în alotransplant: balanța toleranța-rejecție

Protecția imunologică împotriva antigenelor străine la oameni se bazează pe un răspuns coordonat între componentele înnăscută și adaptativă a sistemului imun.

Direcționarea răspunsului imun împotriva antigenelor străine (provenite de la donator) în cazul transplanturilor de organe și țesuturi are drept rezultat rejecția alogrefei.

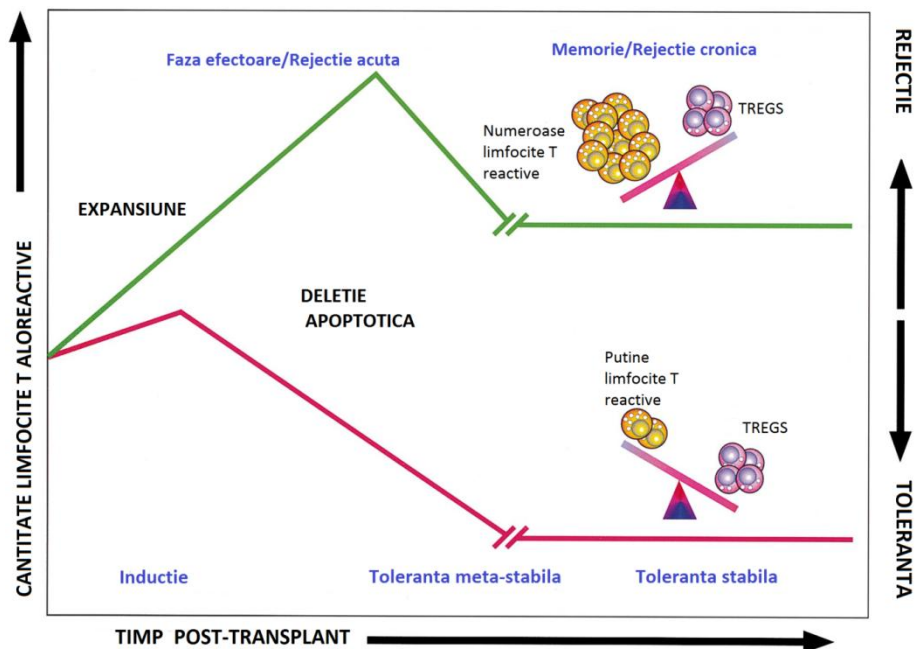
O direcție intensă de cercetare în imunologia transplantului a fost analiza mecanismelor homeostatice normale, ce mențin toleranța self, aceste date reprezentând puncte de plecare în dezvoltarea strategiilor de inducere și menținere a toleranței imunologice în transplant. [31]

Există situații cunoscute de privilegiu imunologic, manifestând natural toleranța imună: toleranța materno-fetală în sarcină, fenomenul Freemartin observat la animale, cât și situsuri anatomice privilegiate imunologic (camera anterioară a ochiului, țesutul cartilajinos). [32-34]

Am prezentat în Partea Generală a tezei mecanismele moleculare ce stau la baza rejecției alogrefelor și inducerii toleranței imunologice. Până în prezent strategiile de inducere a toleranței imunologice au prezentat rezultate extrem de promițătoare în ceea ce privește modelele experimentale utilizând animale mici (modelele murine), însă translația către modelele animale mari și experiența clinică este anevoioasă. S-a observat că inducerea și menținerea toleranței imunologice în cazul transplanturilor de organe este un proces complex, multistadial și multifacetat, incluzând atât mecanisme de deleție clonală cât și mecanisme imunoregulatorii, asociind atât toleranța centrală cât și toleranța periferică. [31]

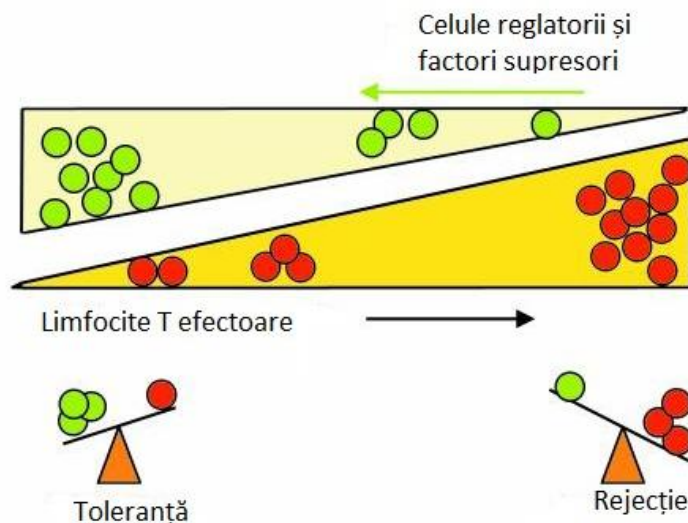
La gazdele la care se obține toleranța donor-specifică putem distinge temporal și din punct de vedere al mecanismelor implicate, 3 faze distincte: inducere, toleranță funcțională și toleranță adevărată. Faza de inducție se referă la perioada în care gazda primește tratament activ având

drept scop inducerea unui status protolerogenic. Aceasta fază include strategii variate: delecționale(eliminarea limfocitelor T mature utilizând anticorpi, imunotoxine și/sau iradiere limfoidă), depleție+inducere de chimerism hematopoietic, abordări non-limfoablative. În cazul unei evoluții favorabile a acestor strategii, urmează o fază de "ignorantă"imunologică, care, dacă nu este perturbată duce la obținerea în viitor a toleranței adevărate; această stare de toleranță meta-stabilă(delecția clonală centrală este incompletă), poate fi perturbată de încărcătura antigenică mare de la nivelul alogrefei, imunogenicitate înaltă sau episoade de rejecție induse prin calea Interleukinei 2. Toleranța adevărată este obținută când indiferent de provocările imunologice la care este expusă alogrefa, nu se produce rejecția acesteia, menținând imunocompetența față de alte antigene(rejecția unui eventual al treilea tip tisular). Mecanismele imunoreglatorii sunt indispensabile în contextul toleranței imunologice. [31] Imaginea următoare redă interacțiunile între mecanismele delecționale și cele imunoreglatorii:



(Modificat după Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity*. 2001;14(4):407-16. Licență Elsevier Nr. 3955911054907)

Un element esențial este modul în care este balansat sistemul imun. Balanța între funcțiile efectorii și cele reglatorii este cea care dictează orientarea răspunsului imun(cum se poate observa în imaginea de mai jos). În prezența unui număr mare de celule efectorare, mecanismele reglatoare(reprezentate de celule reglatoare și factori supresori solubili precum citokinele, sunt incapabile să atenueze răspunsul efector predominant, în contextul transplantului această situație determinând rejecția alogrefei. Dacă numărul de celule efectorare se menține scăzut, mecanismele reglatorii pot deveni eficiente, detinând controlul asupra celor efectorare, în situațiile în care aceste răspunsuri sunt suficient de robuste putând să rezulte toleranța imunologică:[35]



(Modificat după Salama AD, Remuzzi G, Harmon WE, Sayegh MH. Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(7):943-948., articol open access, Copyright © 2001, American Society for Clinical Investigation)

9.2. Abordare conceptuală personală:

Analiza multiplilor factori implicați în influențarea răspunsului imun în alotransplantul vascularizat compozit și posibilitatea direcționării acestora către acceptarea alogrefelor

În prezent acceptarea alogrefelor se bazează pe administrarea terapiei imunosupresoare. Pentru a obține rezultate optime în transplant, culminând cu inducerea toleranței imunologice și acceptarea grefei în absența terapiei imunosupresoare se impune un control foarte bun al răspunsului imun, cu predominarea exprimării mecanismelor reglatorii și supresoare. Toleranța imunologică completă, "Sfântul Graal" al transplantului, este greu de obținut în practica clinică. O abordare bună este cea a toleranței parțiale, ce permite reducerea dozelor terapeutice imunosupresoare. Pentru a se ajunge chiar la această din urmă situație, se impune un efort susținut pentru a promova imunomodularea și menținerea unui mediu pro-tolerogenic.

Astfel, în procesul complex reprezentat de transplantul de organe și cu atât mai mult în cazul alotransplantului vascularizat compozit este esențială direcționarea răspunsului imun către acceptarea alogrefei. În acest sens, nu numai factorii imunologici sunt determinanți, ci întregul parcurs al pacientului în calitate de primitor al unei alogrefe de țesut compozit.

Vom urmări în continuare o serie de parametri implicați în procesul complex al alotransplantului de țesuturi compozite, încercând să identificăm factorii ce pot influența balanța toleranță/rejecție și modalitatea de a orienta dinamica răspunsului imun către acceptarea alogrefei:

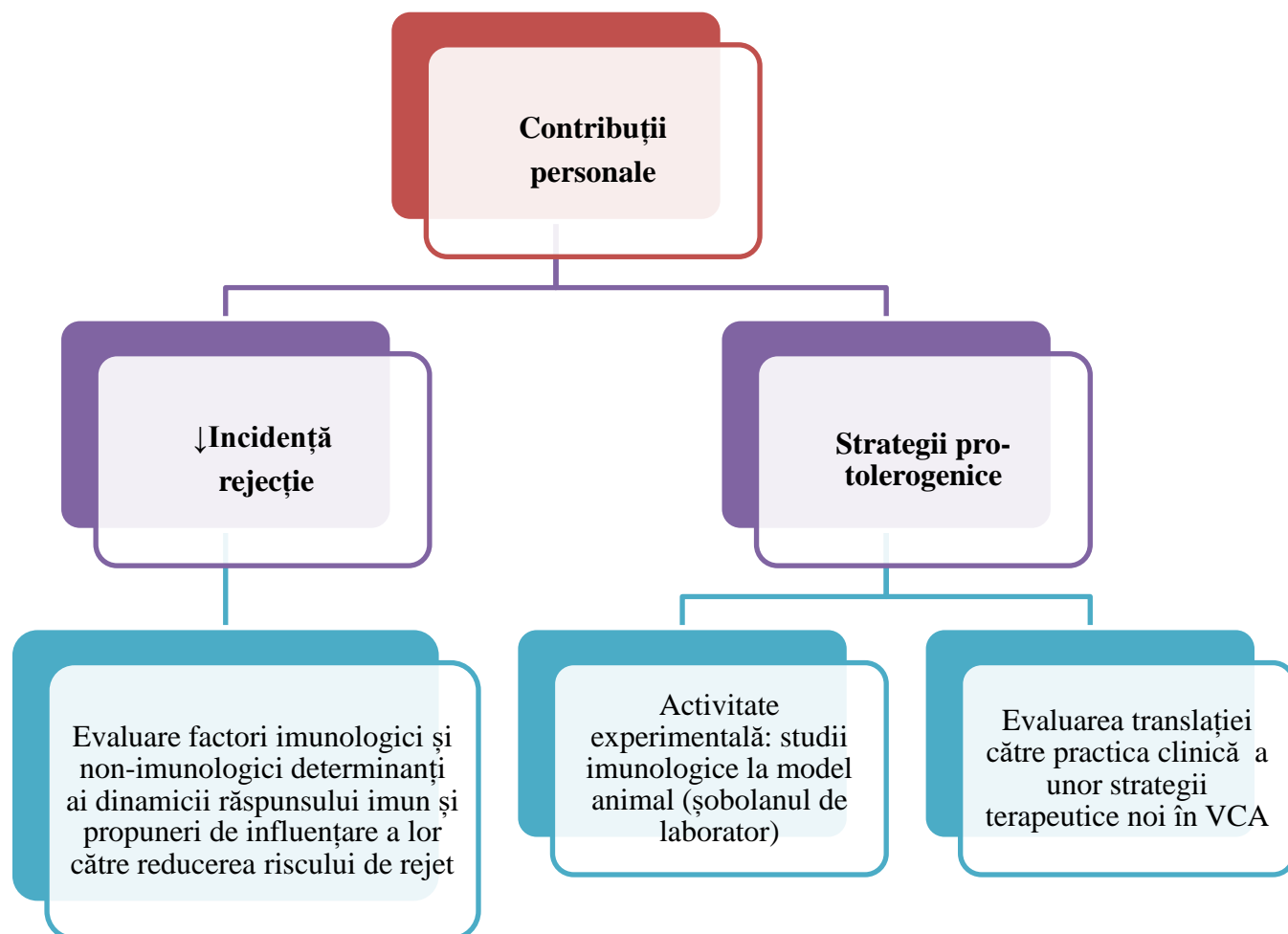


↓ Rejecție

- Program de transplant compozit
- Selecția primitorilor
- Testarea imunologică
- Testarea infecțioasă
- Intervenția chirurgicală
- Urmărirea postoperatorie a pacienților
- Monitorizarea și tratamentul rejecției
- Tratament imunosupresor

Inducerea Toleranței Imunologice

Strategii pro-tolerogenice



10. Analiza factorilor ce influențează direcționarea răspunsului imun în VCA

10.1. Programul de transplant tisular compozit ca factor determinant al rezultatelor funcționale și imunologice în VCA: rolul chirurgului plastician

În cadrul acestui capitol am propus un algoritm general în abordarea defectelor tisulare, am evaluat locul alotransplantului vascularizat compozit în cadrul paradigmatelor reconstructive actuale, am prezentat ierarhia mijloacelor reconstructive a defectelor tisulare utilizând mijloace microchirurgicale, demonstrând prin cazuistica prezentată parcurgerea în Clinica de Chirurgie Plastică, Estetică și Microchirurgie Reconstructivă din cadrul Spitalului Clinic de Urgență București etapelor reconstructive autologe premergătoare alotransplantului compozit.

De asemenea am ilustrat abordarea translatională ca element cheie în implementarea programului de transplant al alogrefelor vascularizate compozite.

10.2. Selecția pacienților în vederea reconstrucției utilizând alotransplantul vascularizat compozit

Am identificat criteriile importante de selecție a candidaților pentru un transplant vascularizat compozit, am analizat balanța risc-beneficiu în cazul potențialilor primitori VCA și am prezentat o evaluare preliminară asupra unei serii de cazuri clinice internate în clinica noastră, pentru a evalua indicația unei potențiale reconstrucții prin alotransplant compozit.

Propunere protocol general de selecție în alotransplantul vascularizat compozit

În urma experienței acumulate, am elaborat următorul protocol general de selecție, ce include atât evaluarea pacienților ce sunt candidați pentru alotransplantul reconstructiv cât și criteriile ce trebuie îndeplinite la nivel instituțional și de către echipa medicală:

Structura cu rol în suport/follow-up:

Instituție cu experiență în domeniul transplantului

Echipa multidisciplinară

Protocoale bine stabilite, sigure

Program adecvat în vederea asigurării medicației imunosupresoare conform regimului stabilit, pe tot parcursul vieții pacientului; susținerea programului de reabilitare și follow-up susținut pe termen lung

Profilaxia infecțiilor/programul de imunizări este necesar pentru astfel de pacienți și trebuie asigurat

Deținerea aprobarilor comisiilor instituționale, în conformitate cu reglementările legale în vigoare

**Evaluarea potențialilor primitori de transplant:**

Aspecte luate în considerare:

-Leziuni foarte severe, încât să justifice transplantul

-Cauza defectului tisular complex(discutabil-patologie tumorală, malformații congenitale)

-Țesut restant suficient pentru a permite reconstrucția stabilă și redobândirea funcționalității, prezența elementelor anatomice în stare adecvată: unitățile musculo-tendinoase, nervi, vase sangvine

-Analiza beneficiilor potențiale obținute prin transplant de membru superior: transplant bilateral versus unilateral/membru dominant versus non-dominant/nivelul amputației/timp scurs de la momentul amputației

-Recuperarea funcțională: evaluare realistă a posibilității de redobândire a funcției pierdute: existența reprezentării corticale, să nu existe afectare nervoasă proximală

-Posibilitatea îmbunătățirii calității vieții pacientului: se evaluează abilitatea de a trai independent înainte de transplant; așteptări realiste ale pacientului legate de potențiala recuperare, în urma transplantului, a funcției pierdute

-Vârsta(recomandabil >18 ani și <65 ani)

-Alte leziuni(amputații adiționale, afectarea vederii/orbire, arsuri extensive)

-Comorbidități

Risc chirurgical crescut(afecțiuni cardiovasculare, diabet, coagulopatii, afectare vasculară în cadrul afecțiunilor autoimune)

Recuperare funcțională: afectare neurologică

Complicații imunologice: pacienți înalt sensibilizați, multiplu transfuzați, având un alt transplant în antecedente

Afecțiuni sistemice ce interferă cu administrarea terapiei imunosupresoare:

Infecții active/latente: HIV, Hepatite B, C, CMV, osteomielite, infecții cu MRSA, infecții fungice

Afecțiuni maligne: prezente/metastatice/în antecedente

Pacienți deja imunosupresați: fiind deja beneficiarii unui transplant de organ; pacienți imunocompromiși

Compatibilitatea donator-primitor este importantă(ideal să existe concordanță de: sex, vârstă, rasă, grup sangvin, tip HLA(Human Leukocyte Antigen)



Pregătire tehnică: infrastructură adecvată, prezența dispozitivelor medicale necesare asigurării fezabilității unei astfel de intervenții, experiență chirurgicală corespunzătoare prealabilă, pregătirea în vederea intervenției propriu-zise(logistică, disecții la cadavru)

**Considerente etice, sociale, psihologice și psihiatrice**

Abilitatea pacientului de acordare a consimțământului informat

Expectative realiste asupra procedurii, informare corectă

Complianța la programul de reabilitare și la administrarea terapiei imunosupresoare

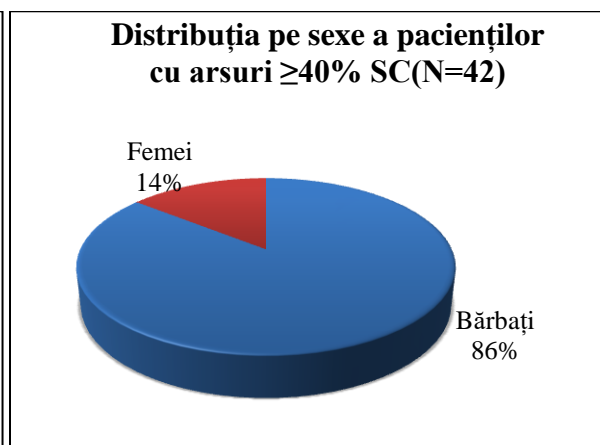
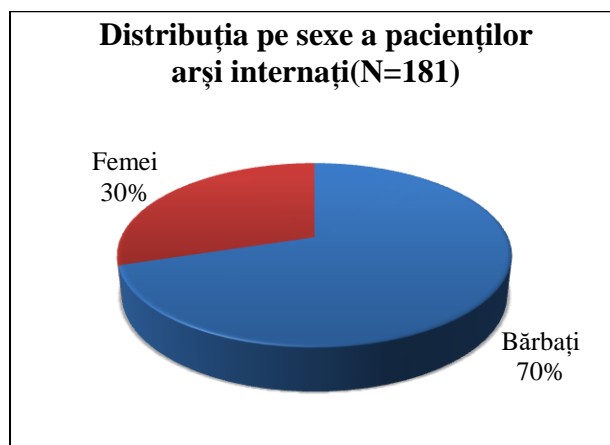
Fără probleme psihosociale serioase, incluzând alcoolism, dependența de droguri.Nu se acceptă pacienți fumatori

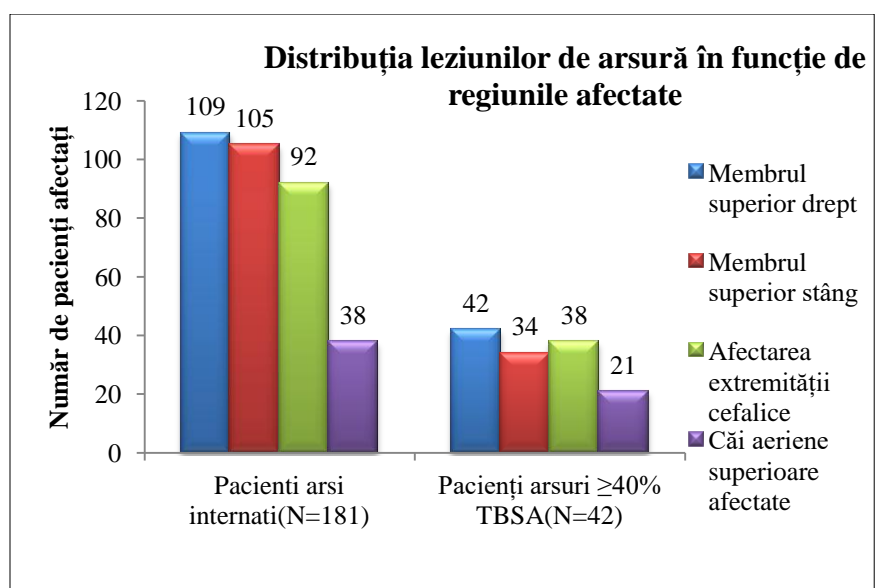
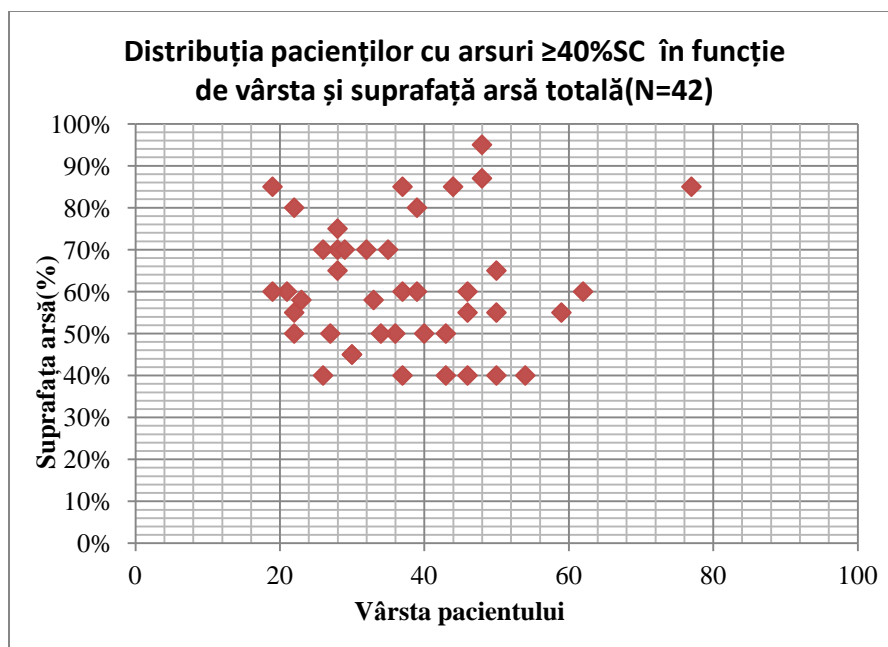
Evaluarea pacienților arși ca potențiali candidați pentru reconstrucția utilizând alotransplantul vascularizat compozit: considerente clinice și imunologice

Am analizat pacienții arși internați în clinica noastră pentru a determina leziunile cu grad ridicat de severitate, ce afectează zone funcționale și care reprezintă potențiale provocări pentru o reconstrucție optimă folosind tehnici convenționale, având în vedere perspectiva folosirii alogrefelor vascularizate compozite drept potențiala soluție pentru pacienții selectați.

Între octombrie 2011 și decembrie 2015, 181 de pacienți arși au fost internați în clinica noastră, Tabelul și graficele următoare ilustrează rezultatele obținute:

	Numărul total de pacienți	Electrocuții (Numărul de pacienți/ procentaj)	Membrul superior drept	Membrul superior stâng	Afectarea extremității cefalice	Căi aeriene superioare afectate
Pacienți arși internați	181	18 (9.94%);	109 (60.22%)	105 (58.01%)	92 (50.82%)	38 (20.99%)
Pacienți cu zone arse $\geq 40\%$ SC	42 (23.30%)	11 (26.19%)	42 (100%)	34 (80.95%)	38 (90.47%)	21 (50%)





În cazul a 5 pacienți de sex masculin, s-a impus amputația de necesitate a membrilor superioare: la trei pacienți, după electrocuție la tensiune înaltă (la doi pacienți, amputație la nivelul brațului drept, iar la un pacient, amputație bilaterală a brațelor) și în cazul a doi pacienți, după arsuri termice (la unul dintre pacienți, la nivelul articulației radio-carpene iar la celălalt pacient la nivelul treimii distale a antebrăului stâng).

Nouă pacienți (șapte bărbați și două femei) au necesitat amputația degetelor, la nivele diferite, șapte dintre aceștia suferind arsuri termice, iar 2, electrocuții.

Alogrefele de piele au fost folosite pentru acoperire temporară pentru 17 pacienți cu arsuri extinse, atunci când resursele autologe au fost limitate sau în cazul pacienților cu o stare generală gravă, ceea ce nu a permis autogrefarea după excizia leziunilor arse. Alogrefele de piele au fost

aplicate după o expansiune anterioară (rată de 1:3). În cazul a trei pacienți, am observat integrarea și persistența pe termen lung a alogrefelor (pentru mai mult de 21 de zile).

Administrarea de sânge și a derivaților a fost necesară în cazul tuturor pacienților arși pe suprafețe extinse și, de asemenea, măsuri de îngrijire intensivă de susținere a vieții au fost necesare pentru menținerea funcțiilor vitale pentru acești pacienți.

Discuții

Arsurile sunt leziuni severe ce afectează predominant populația tânără, bărbații fiind mai predispuși la asemenea accidente decât femeile. Și în cazuistica prezentată mai sus, se observă afectarea cu preponderență a pacienților de sex masculin, mai ales în cazul arsurilor extensive. De asemenea se observă o medie de vârstă scăzută a acestor pacienți, fiind evident impactul deosebit al arsurilor, ca problemă de sănătate publică, existând risc vital în cazul arsurilor extensive, iar pentru supraviețuitorii ce prezintă sechele post-combustionale calitatea vieții este sever afectată, cu implicații psiho-emoționale, familiale și dificultăți de reinsertie socio-profesională.

Un grup aparte de pacienți este reprezentat de cei cu arsuri extensive, profunde de grade IIB și III, ce acoperă mai mult de 40% SC, care necesită o îngrijire intensivă în faza acută a arsurii și care au o recuperare dificilă, cu riscul apariției complicațiilor severe, chiar la timp îndelungat după accident. Arsurile căilor aeriene superioare sunt situații nefavorabile, ce cresc severitatea leziunilor. Un bun suport sistemic alături de o excizie imediată a arsurii, precum și grefarea precoce sunt elemente esențiale ce influențează recuperarea pacientului cu arsuri extensive.

Există câteva aspecte particulare de luat în considerare atunci când există posibilitatea folosirii VCA drept o opțiune reconstructivă pentru pacienții arși:

- Nevoia de o echipă interdisciplinară și un program complex de transplant alături de un suport instituțional adecvat.
- Selecția atentă a primitorilor: conceptele generale referitoare la criteriile de selecție pentru VCA se aplică, însă pot apărea anumite probleme cu pacienții arși, ce afectează rezultatul final al procedurii: din cauza leziunilor extensive, în cazul pacienților arși, modificarea arhitecturii tisulare este de obicei o problemă ce rezultă după leziunea inițială și după multiple proceduri reconstructive realizate anterior; în această situație, anatomia este modificată, structurile pot fi discontinue, dezorganizate și pediculii vasculari afectați. Drenajul venos este de asemenea afectat la pacienții arși, în special sistemul venos superficial.
În cazul electrocuțiilor la tensiuni înalte, pierderea masivă de țesut este regulă, cu implicarea și dezorganizarea multiplelor structuri anatomice, precum mușchi, nervi, vase sangvine, rezultând, uneori, o zonă primitoare inadecvată pentru procedeele de reconstrucție microchirurgicală. De asemenea, pierderea masei musculare și a componentei nervoase pe zone extinse determină un prognostic funcțional prost, chiar și după transplant. O evaluare imagistică preoperatorie precisă este obligatorie, utilizându-se tehnologii precum Angio-CT sau Angio-RMN pentru vizualizarea vascularizației, raporturilor anatomice între structuri și aspectului tridimensional al regiunii.
- Evaluarea statusului sistemic este obligatorie pentru pacientul ars.

- Alte deficite pot fi observate: neurologice, senzoriale, psihologice, făcând astfel programul de reabilitare mult mai dificil de susținut după transplant. Pentru un rezultat optim, reintegrarea corticală este foarte importantă.
- Momentul transplantului: de obicei, procedurile VCA sunt electiv, efectuate după o bună pregătire medicală și instituțională. În cazul pacienților arși, trebuie efectuată o evaluare dinamică dacă leziunea este recentă și urmează o perioadă de așteptare pentru obținerea unei situații locale stabile cu un status sistemic satisfăcător. Monitorizarea seriată, în dinamică, a leziunilor este efectuată pentru a evalua rezultatele tehnicilor chirurgicale convenționale dacă acestea sunt propuse pentru pacient. Din momentul acceptării pacientului în programul de transplant, perioada de așteptare depinde de posibilitatea găsirii unui donator potrivit.
- Pregătirea chirurgicală adecvată și o coordonare bună a echipelor medicale în timpul procedurii (la pacienții arși, este necesară o disecție elaborată).
- Un program de reabilitare post-operatorie adecvat.
- Aspecte imunologice: cel mai important aspect este prevenirea rejecției alogrefei. Statusul imunologic al pacientului este important pentru succesul VCA. Sistemul imun este afectat la pacienții cu arsuri extinse. În timpul perioadei acute, după leziune, un status sistemic imunosupresor este descris [36]. Acesta este motivul pentru care se poate observa integrarea alogrefelor de piele și persistența lor pe termen lung, aspect observat și la 3 dintre pacienții noștri.

Transfuzia de sânge și a derivaților sangvini în arsurile severe este obligatorie; aceasta poate fi asociată cu un grad crescut de sensibilizare. Așa cum am văzut anterior, există multiple cauze ce pot duce la sensibilizarea pacientului ars.

Sensibilizarea HLA trebuie evitată, pe cât posibil, pentru a menține viabilă opțiunea alotransplantului de țesuturi vascularizate compozite în cazurile indicate. Însă, în faza acută a arsurilor extinse, prioritatea este reprezentată de supraviețuirea imediată și de acoperirea eficace a zonelor arse, pentru a se asigura un prognostic bun pentru pacient. Klein et al. au identificat o listă de cauze ale sensibilizărilor în cazul pacienților arși, ilustrată în tabelul următor[37]:

Cauza	Observații
Sarcina	Sensibilizare HLA Riscul sensibilizării crește cu numărul de sarcini ale femeii
Transfuzii de sânge	Pacienții cu arsuri extinse necesită multiple transfuzii de sânge
Transplant anterior	Transplant anterior de organ Re-transplantare VCA în cazul transplantului eșuat
Alogefe din piele umană (homogrefe)	Sunt folosite frecvent pentru acoperirea temporară a arsurilor extinse, când sursele autologe nu sunt disponibile sau acoperirea autologă nu este posibilă, din cauza factorilor locali sau sistemici
Dispozitive de asistare	VAD(dispozitive de asistare ventriculară) ECMO(oxigenare membranară extra-corporeală) Dializa este controversată în a reprezenta un factor de risc pentru sensibilizare
Situații proinflamatorii	Stimulare imună independentă de HLA Infecții, septicemie

O soluție poate fi reprezentată de dezvoltarea substituenților de piele și a țesuturilor obținute prin bioinginerie, metode ce pot oferi acoperire în timpul fazei acute a arsurii, fără să declanșeze sensibilizarea HLA [38]. Scopul pe termen lung în medicina de transplant este de a se induce toleranța imunologică donor-specifică, pentru a evita toxicitatea imunosupresiei, un aspect esențial pentru pacienții arși, mulți dintre aceștia prezentând diferite grade de disfuncții de organe (renală, hepatică), chiar și la mult timp după producerea arsurii.

10.3. Propunere protocol de testare imunologică

Testarea histocompatibilității donor-primator pentru a stabili riscul imunologic la potențialii candidați la un transplant VCA este de mare importanță, ca de altfel și statusul sensibilizării prealabile al pacienților. De asemenea, protocoalele de monitorizare imunologică post-transplant utilizând o paletă largă de teste serologice, analiză celulară, cât și metode noi de analiză (bazate pe genomică, proteomică) sunt esențiale în optimizarea supraviețuirii și funcționalității pe termen lung a alogrefelor. În baza experienței existente la nivel internațional în transplantul tisular compozit, cât și a recomandărilor naționale, propunem urmatorul protocol de testare imunologică în transplantul alogrefelor vascularizate compozite[39-41]:

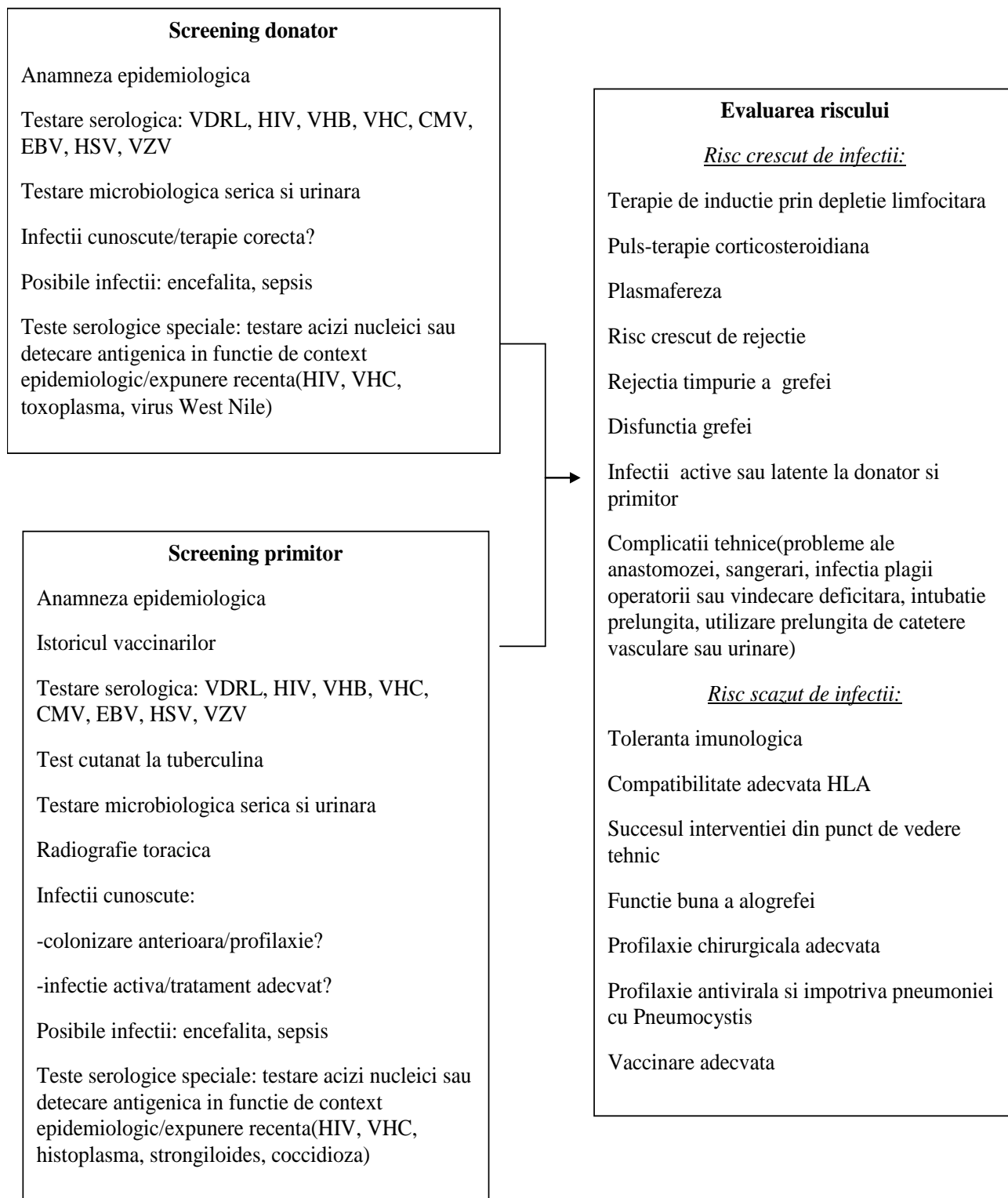
Testare pre-transplant
Tipizare HLA Screening anticorpi anti-HLA Testul Crossmatch
Monitorizare post-transplant
Monitorizarea anticorpilor HLA Monitorizarea anticorpilor non-HLA Monitorizarea funcțiilor limfocitelor T Monitorizarea chimerismului Imunologia rejetului Monitorizarea medicației imunosupresoare

10.4. Propunere protocol de evaluare a infecțiilor în alotransplantul vascular compozit

Complicațiile infecțioase sunt o cauză importantă de morbiditate și chiar mortalitate a pacienților transplantați, imunosupresați cronic. Din acest motiv, evaluarea atentă atât a donatorului cât și a primitorului alotransplantului, cu stabilirea gradului de risc de dezvoltare a complicațiilor infecțioase, constituie o etapă esențială, cu implicații atât în ceea ce privește recuperarea funcțională și statusul imunologic post-transplant, cu consecințe asupra supraviețuirii alogrefei pe termen lung.

Propunem următorul protocol de evaluare a infecțiilor în alotransplantul vascular compozit, adaptat în funcție de recomandările existente în cadrul Societății Mondiale de Transplant[42]:

Protocol de evaluare a infecțiilor în VCA



10.5. Intervenția chirurgicală de transplant vascularizat compozit și urmărirea postoperatorie a pacienților: influențe asupra rezultatelor functionale și aspectelor imunologice

10.5.1. Prezentare generală

Odată ce pacientul a fost acceptat pentru un transplant tisular compozit, este necesară o planificare preoperatorie riguroasă a intervențiilor chirurgicale de prelevare a alogrefei de la donator și transplant propriu-zis la primitor. Dacă transplantul necesită o disecție neobișnuită a primitorului sau a donatorului, sunt necesare sesiuni de practică la cadavru. Spre exemplu în cazul transplantului de mână, diferențele principale între operațiile de replantare și cele de transplant constau în faptul că nivelul de amputație este diferit la primitor și la donator și există o incertitudine în privința lungimii și calității a vaselor, nervilor, mușchilor și tendoanelor primitorului, care persistă până la debutul operației. Multe centre realizează studii imagistice pentru a obține o hartă a vascularizației pacientului. Ultrasonografia, și alte metode de imagistică cum sunt CT, IRM-ul sau angiografiile, pot fi de asemenea folosite pentru a realiza această mapare a vascularizației.[43] Un algoritm de transplant este necesar ca parte din procesul de planificare. Acest algoritm trebuie folosit de medicul coordonator de transplant și de chirurgul principal pentru a identifica ce consulturi și investigații vor fi necesare și momentul efectuării acestora când va exista un donator adecvat.

Ar trebui să existe cel puțin două echipe de chirurghi, cu cel puțin doi chirurghi pe echipă cu bună experiență microchirurgicală, alotransplanturile vascularizate compozite fiind proceduri complexe, cu durată îndelungată.

Pacienții care beneficiază de transplant trebuie să fie monitorizați cu atenție atât de echipa chirurgicală cât și de cea a anesteziei. Recent, Caterson et al. au emis ipoteza prin care aceste leziuni de ischemie-reperfuzie reprezintă cauza primară de afectare a grefei și de inițiere a rejecției alogrefelor [44]. Planificarea preoperatorie, coordonarea și comunicarea dintre echipele chirurgicale sunt de o importanță deosebită pentru a reduce timpul de ischemie și complicațiile operatorii.

De asemenea este important de acordat o atenție deosebită în ceea ce privește gesturile chirurgicale: se impun manevre cât mai atraumatice, manipularea cu blândete a țesuturilor aflate în compoziția alogrefei, tehnica precisă în reconstrucția fiecărei structuri, evitând orice sursă de fenomene pro-inflamatorii ce ar putea constitui un factor declanșator al răspunsurilor imune ce duc la rejețul alogrefei.

Monitorizarea atentă postoperatorie a alogrefei este esențială pentru a preveni dezvoltarea unor complicații și compromiterea funcționalității grefei.

În cazul VCA, ce au rol în refacerea calității vieții primitorilor, recuperarea funcțională la nivelul alogrefei este un aspect primordial, făcând obligatorie existența unui program instituțional bine pus la punct, pentru a susține pacientul pe tot parcursul îngrijirilor post-operatorii.

10.5.2. Contribuții personale în pregătirea în vederea efectuării procedurilor de alotransplant vascularizat compozit

Am luat în considerare atât utilitatea evaluărilor imagistice preoperatorii cât și importanța efectuării de disecții la cadavru proaspăt, cu scopul pregătirii în vederea alotransplanturilor vascularizate compozite, pentru a putea obține cele mai bune rezultate din punct de vedere chirurgical și imunologic.

În continuare sunt prezentate cele 2 direcții de studiu abordate:

- studiu imagistic;
- studiu anatomic-chirurgical la cadavru proaspăt;

10.5.3. Studiu Imagistic: Evaluarea Vascularizației Arteriale a Peretelui Abdominal Inferior Folosind Angio-Computer Tomografia. Potențialul aplicării în alotransplantul vascularizat compozit

Studiul a fost efectuat în cadrul programului internațional de mobilitate, efectuat în Spitalul UZ Leuven, Leuven, Belgia, susținut de Programul Sectorial Operațional Dezvoltarea Resurselor Umane (SOP HRD), finanțat de către Fondul Social European și de către Guvernul României cu numărul de contract POSDRU/159/1.5/S/13739

Scopul studiului

Scopul acestui studiu este de a evalua utilitatea Angio-Computer Tomografiei multislice în descrierea distribuției vasculare în regiunea selectată, evaluarea calibrului vaselor și ramificarea acestora, evaluarea variațiilor anatomice și raporturilor tridimensionale cu alte structuri.

În Spitalul UZ Leuven, scanarea angio-CT a peretelui abdominal inferior este efectuată ca o investigație preoperatorie standard (exceptând cazurile ce au contraindicații pentru procedură), pentru pacientele ce sunt candidate pentru reconstrucții mamare autologe cu lambouri DIEP (lambourile bazate pe perforantele arterei epigastrice inferioare profunde).

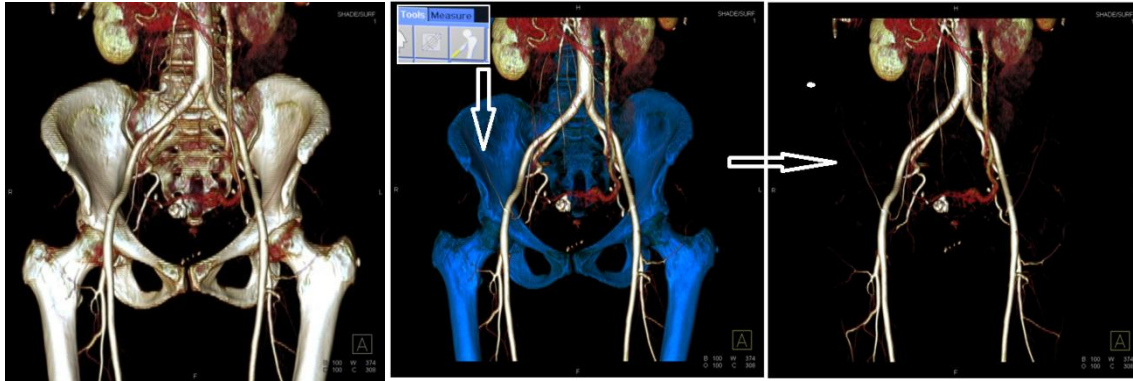
Am urmărit evaluarea eficienței acestei tehnologii și potențialul acesteia în îmbunătățirea rezultatelor în transplantul vascularizat compozit, prin efectuarea unei bune planificări preoperatorii cât și monitorizarea vasculară pe termen lung.

Material și metodă

Am analizat arterele epigastrică inferioară profundă și circumflexă iliacă profundă pe imaginile angio-CT la 50 paciente (100 hemiabdomene analizate) ale spitalului UZ Leuven, utilizând aplicația Lightbox 6.1.7, versiunea UZL (A). Am analizat topografia arterelor peretelui abdominal, cu raporturile lor cu structurile înconjurătoare, urmărind și variațiile anatomice. De asemenea, am măsurat, utilizând aceeași aplicație, diametrele arterelor epigastrică inferioară profundă și circumflexă iliacă profundă, după ce acestea s-au desprins din artera iliacă externă.



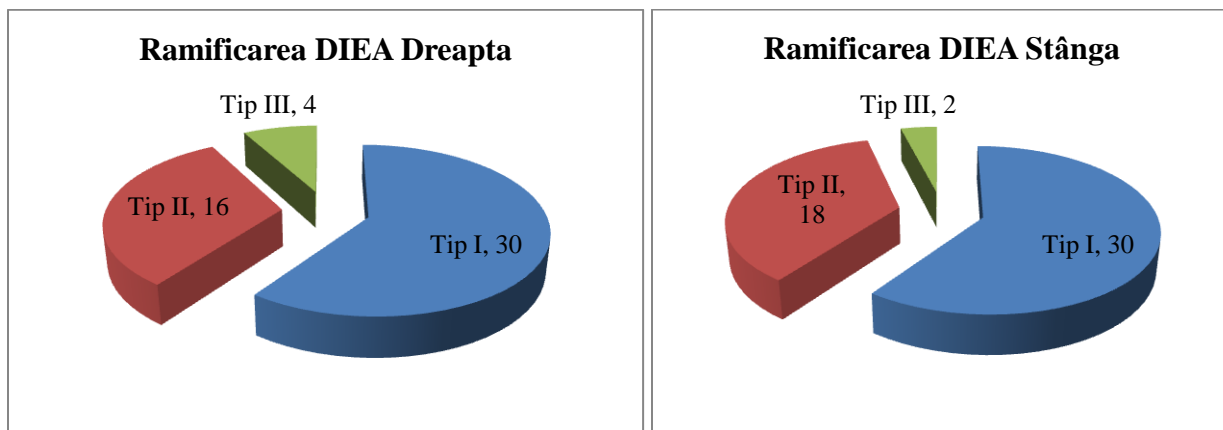
Evaluarea arterei iliace externe a fost efectuată la 20 din cele 50 de paciente, pe aceleași scanări angio-CT, dar utilizând o platformă performantă de analiză a imaginilor- InSpace, o aplicație specifică pentru post-procesare a Sistemului Medical Siemens.



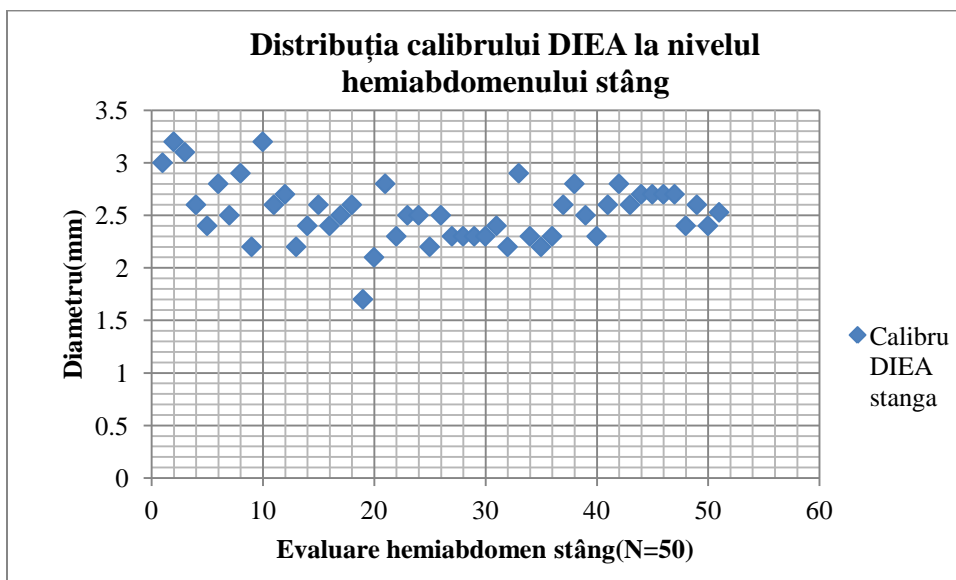
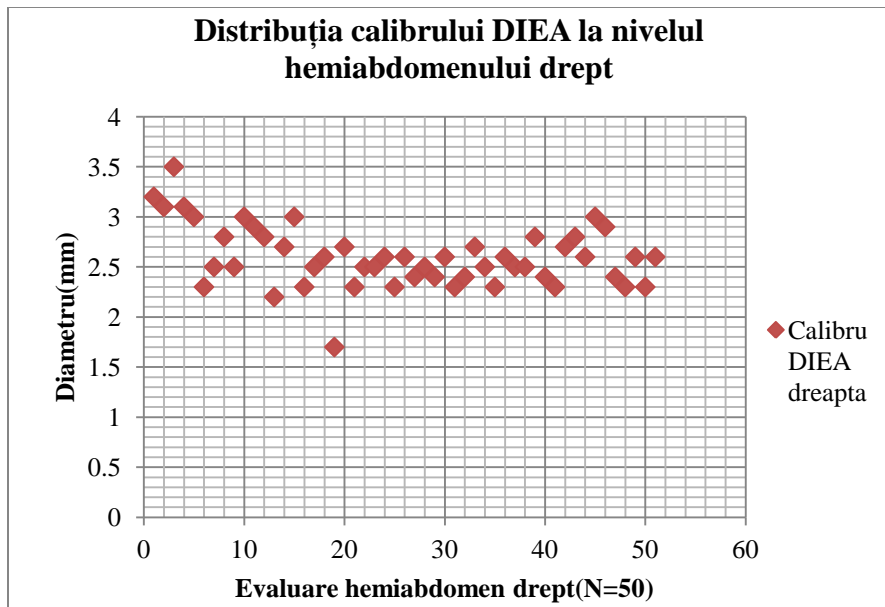
Rezultate

Graficele următoare ilustrează rezultatele obținute în cadrul studiului imagistic.

Evaluarea DIEA și DCIA

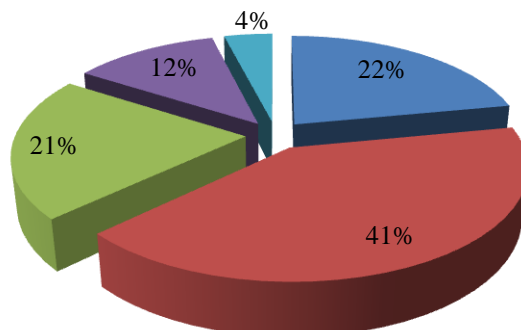


Calibrul DIEA a fost evaluat, fiind obținute următoarele rezultate: pe partea dreaptă, calibrul DIEA a variat între 1.7 și 3.5mm, cu o medie de 2.6 mm; pe partea stângă, valorile au fost cuprinse între 1.7 și 3.1mm, cu o medie de 2.528mm.

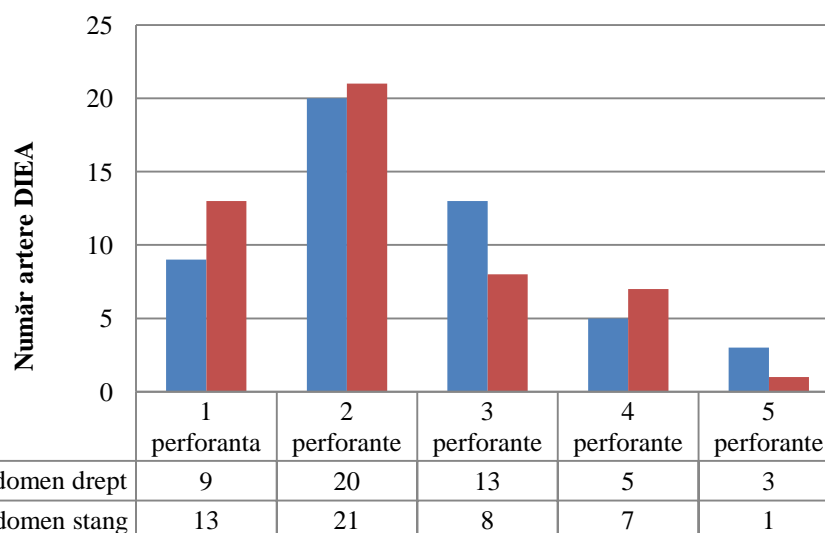


Nr. de perforante de calibru mare/Nr. total DIEA

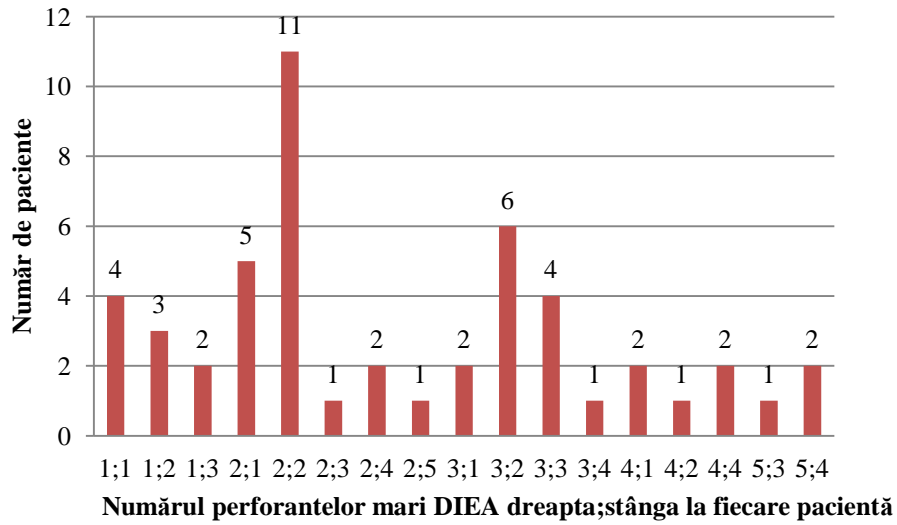
■ 1 perforanta ■ 2 perforante ■ 3 perforante ■ 4 perforante ■ 5 perforante



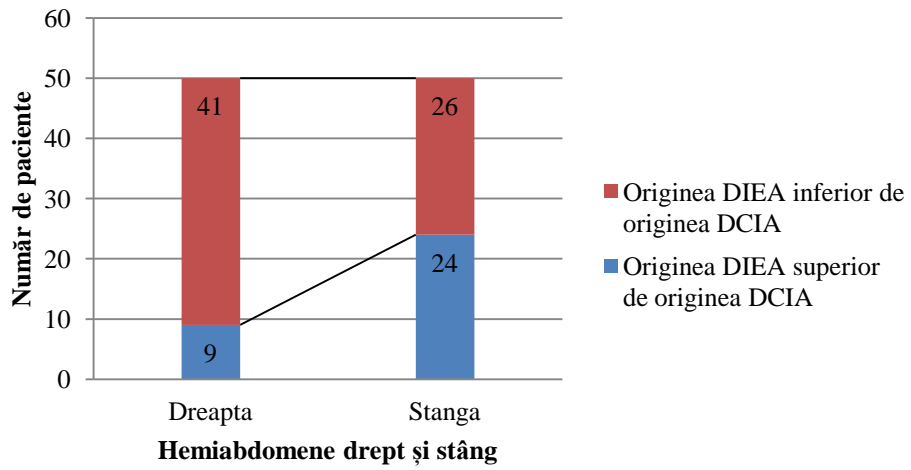
Distributia perforantelor DIEA de calibru mare

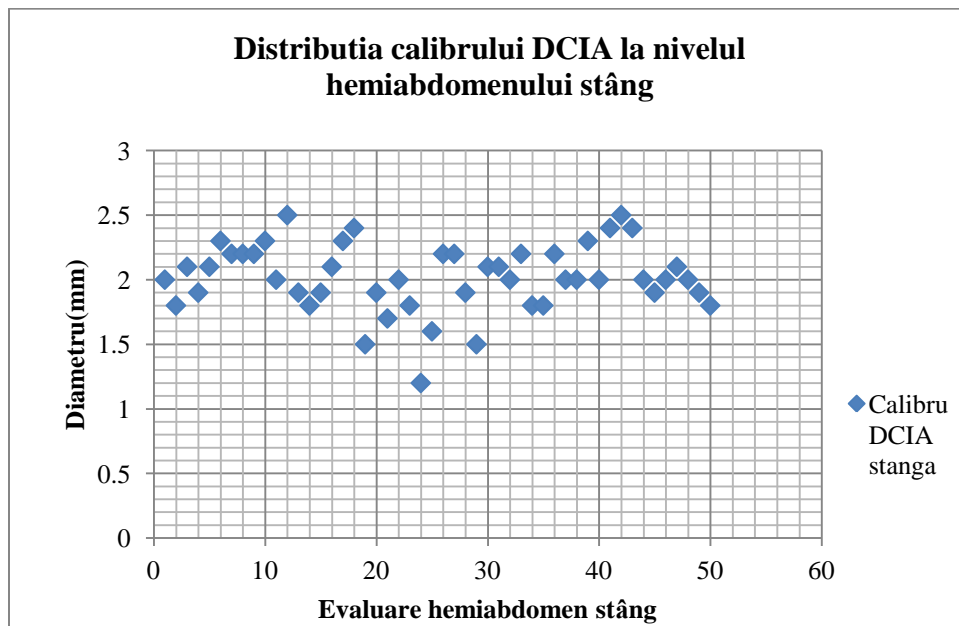
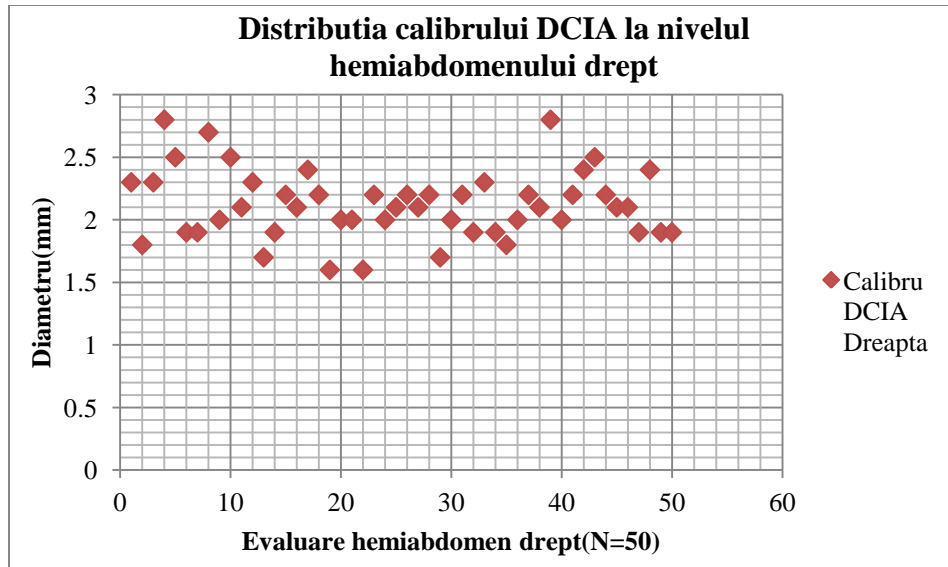


Distribuția perforanțelor mari DIEA la pacienți

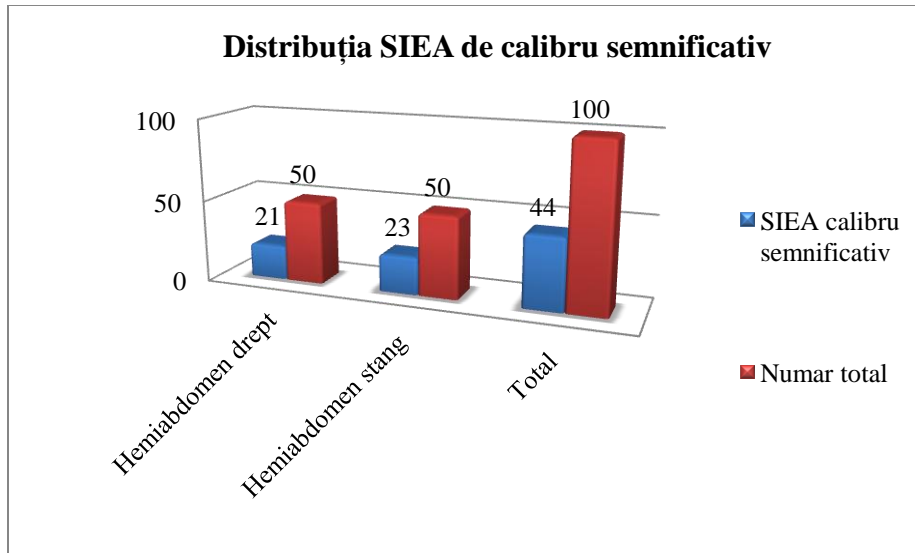


Variații anatomiche în emergența DIEA și DCIA



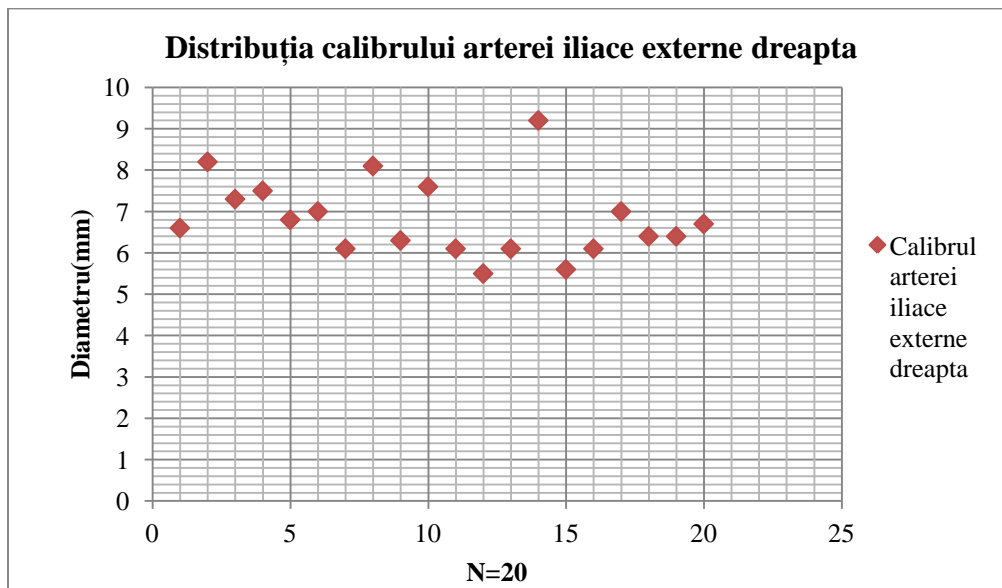


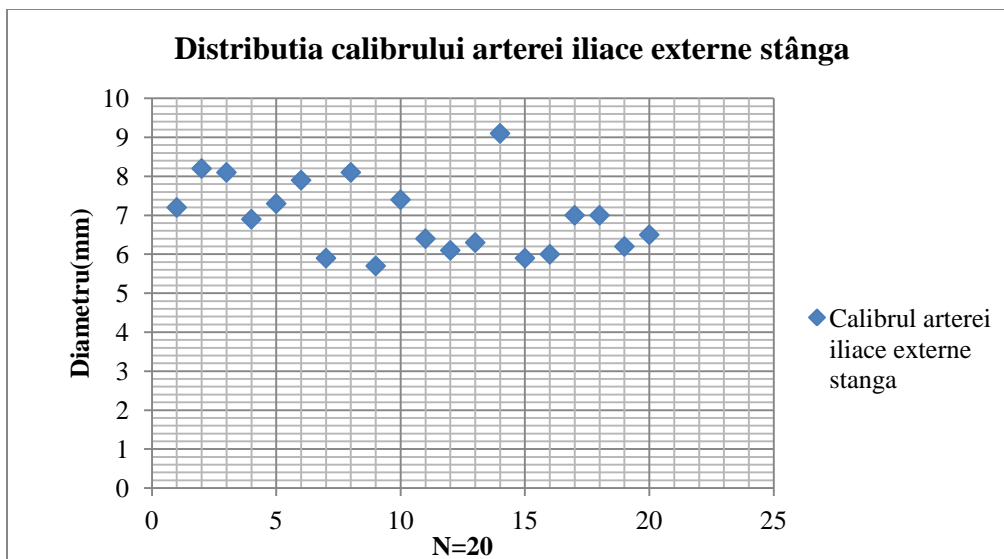
Vizualizarea SIEA



Evaluarea arterelor iliace externe

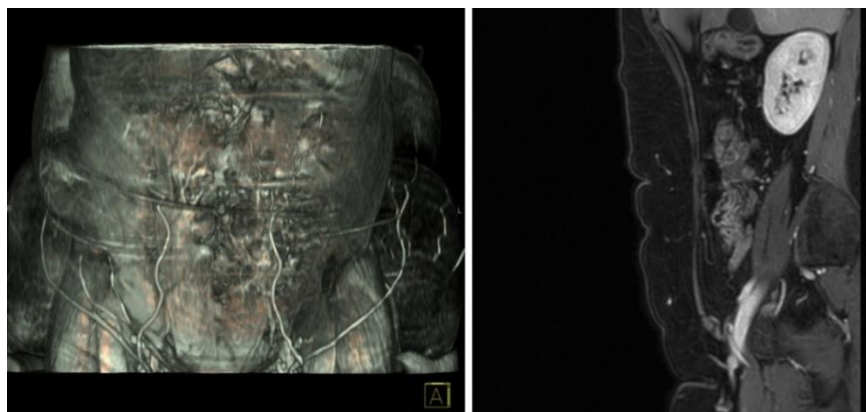
Calibrul arterei iliace externe drepte variaza între 5.5 și 9.2 mm (cu o medie de 6.83) și calibrul arterei iliace externe stangi variaza între 5.7 și 9.1 mm (cu o medie de 6.96 mm).





10.5.4. Evaluarea peretelui abdominal inferior prin Angio-RMN: caz clinic

Am evaluat de asemenea un caz al Clinicii din Leuven pentru care examinarea peretelui abdominal inferior s-a efectuat utilizând investigația angio-RMN.

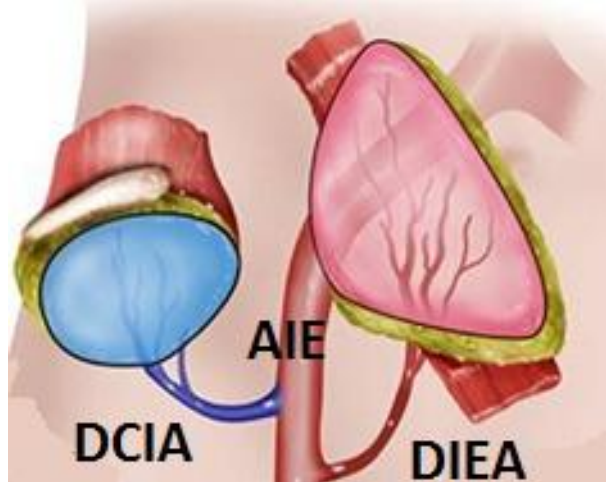
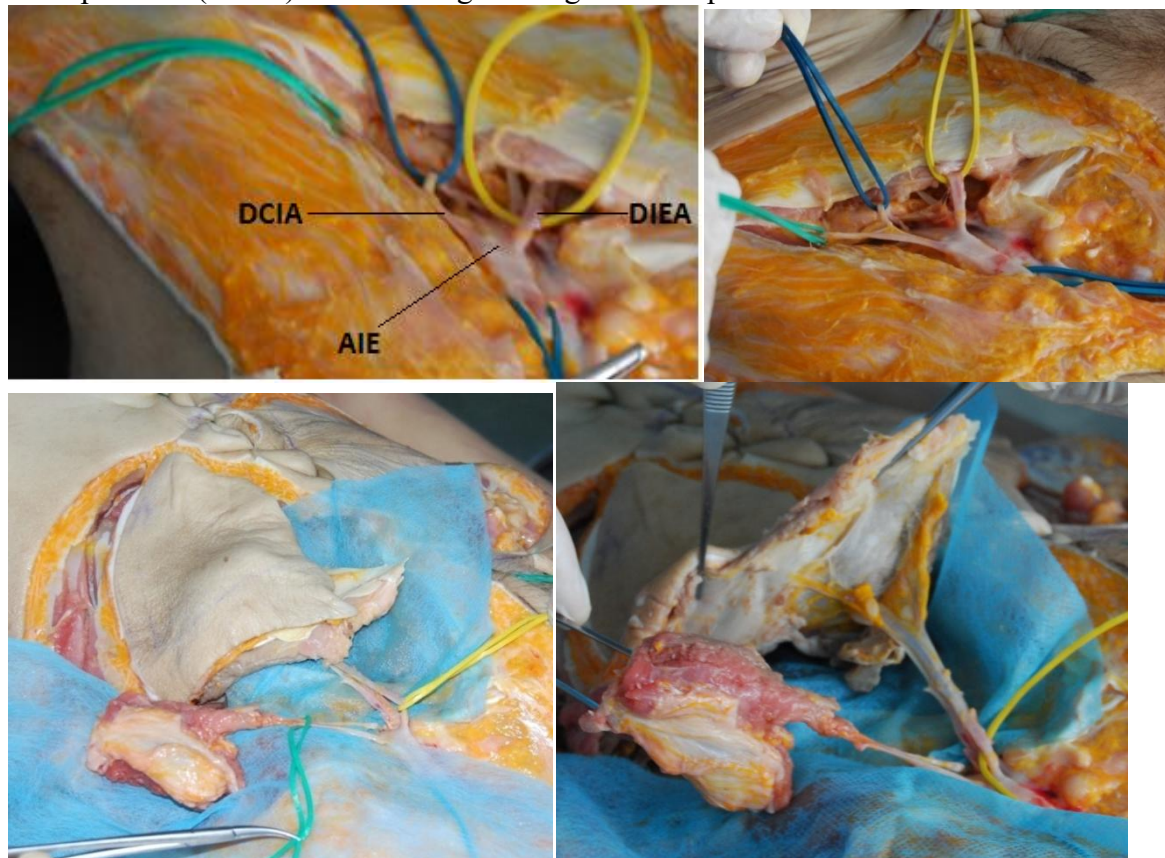


10.5.5. Studiu anatomo-chirurgical la cadavru proaspăt asupra peretelui abdominal inferior

În urma familiarizării cu imagistica angio-CT a regiunii abdominale inferioare, am considerat utilă completarea experienței prin efectuarea de disecții la cadavru proaspăt în vederea analizării vascularizației regionale și raporturilor acestora cu structurile adiacente, având de asemenea în vedere explorarea tehnicilor chirurgicale implicate în transplantul de perete abdominal. Toate studiile efectuate la cadavre umane au respectat normele etice și legale, instituționale și naționale.

Alotransplantul de perete abdominal reprezintă o alternativă importantă de studiat în cadrul VCA, fiind efectuat în asociere cu transplantul de organe pentru reconstrucția abdominală în cazul defectelor tisulare extensive. [45]

Imaginile următoare surprind artera iliacă externă(AIE), sub ligamentul inghinal, cu sediul de emergentă de la nivelul acesteia a arterelor epigastrică inferioară profundă(DIEA) și circumflexă iliacă profundă(DCIA) la nivelul regiunii inghinale drepte:



Aspect schematic al lambourilor deservite de arterele DIEA și DCIA

(Hollenbeck ST, Senghaas A, Turley R, Ravindra KV, Zenn MR, Levin LS, Erdmann D., *The extended abdominal wall flap for transplantation, Transplant Proc.* 2011;43(5):1701-5 Copyright Clearance Center, Licență Nr. 3722001238803)

10.5.6. Discutii

Discuțiile au urmărit următoarele aspecte:

-evaluarea rezultatelor obținute în cadrul studiilor personale: bazându-ne pe scanările angio-CT efectuate pacienților clinicii din Leuven, am făcut o apreciere a principalelor surse arteriale la nivelul peretelui abdominal inferior. Examinarea arterelor epigastrice inferioare profunde a

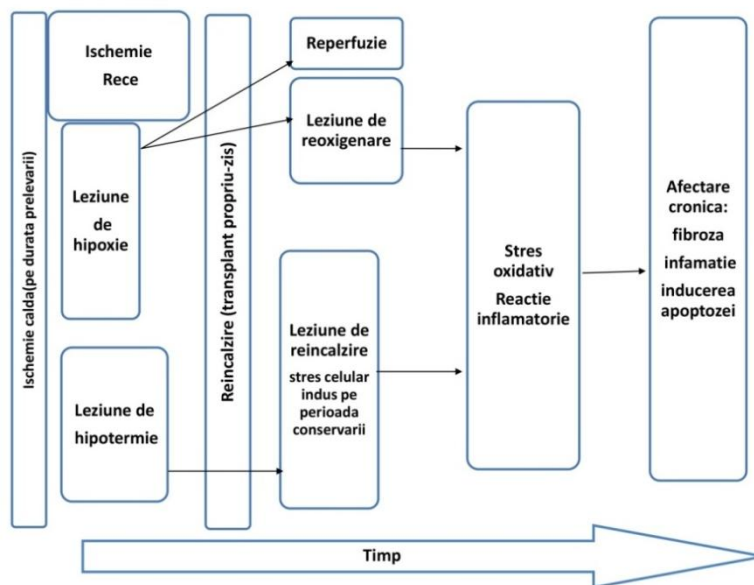
reprezentat scopul inițial al scanărilor descrise anterior, dar și alte informații prețioase în ceea ce privește restul arterelor pot fi obținute după cum s-a putut observa în cadrul studiului imagistic prezentat. Artera circumflexă iliacă profundă a putut de asemenea fi evaluată în imaginile analizate, putând de asemenea determina calibrul acesteia și în unele situații chiar patern-ul ramificării acesteia.

Scanarea angio-CT s-a dovedit un instrument valoros pentru obținerea informațiilor anatomice detaliate în ceea ce privește vascularizația regională cât și raporturile topografice cu restul structurilor anatomice.

-aprecierea utilității scanării angio-CT la pacienții ce beneficiază de alotransplant vascularizat compozit: în procedurile de alotransplant tisular compozit, colaborarea cu radiologul este obligatorie pentru a evalua vasele sangvine optime pentru anastomoze și pentru a vizualiza, de asemenea, arhitectura tridimensională a structurii (de cele mai multe ori modificată în urma mecanismului lezional și a intervențiilor chirurgicale precedente) pentru o disecție precisă, cu scopul de a reduce riscul de hemoragie critică și timpul de ischemie.

-studii preliminare în transplantul de perete abdominal: studiul imagistic și cel anatomo-chirurgical efectuat la cadavru proaspăt s-a dovedit de asemenea util, demonstrând fezabilitatea realizării unei astfel de intervenții chirurgicale reconstructive.

-evaluarea leziunii de ischemie-reperfuzie, determinant major al direcționării răspunsului imun în alotransplant



Prezentarea schematică a mecanismelor leziunii de ischemie-reperfuzie[46] (Modificat după Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T., Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:532127. doi: 10.1155/2011/532127, Articol open access sub licență Creative Commons Attribution 3.0 Unported License)

Există un consens asupra faptului că leziunea de ischemie-reperfuzie produce un răspuns inflamator local persistent, robust la nivelul alogrefei, fiind o barieră esențială în supraviețuirea

alogrefei pe termen lung și în posibilitatea achiziției toleranței imunologice în transplantul de organe solide.[47]

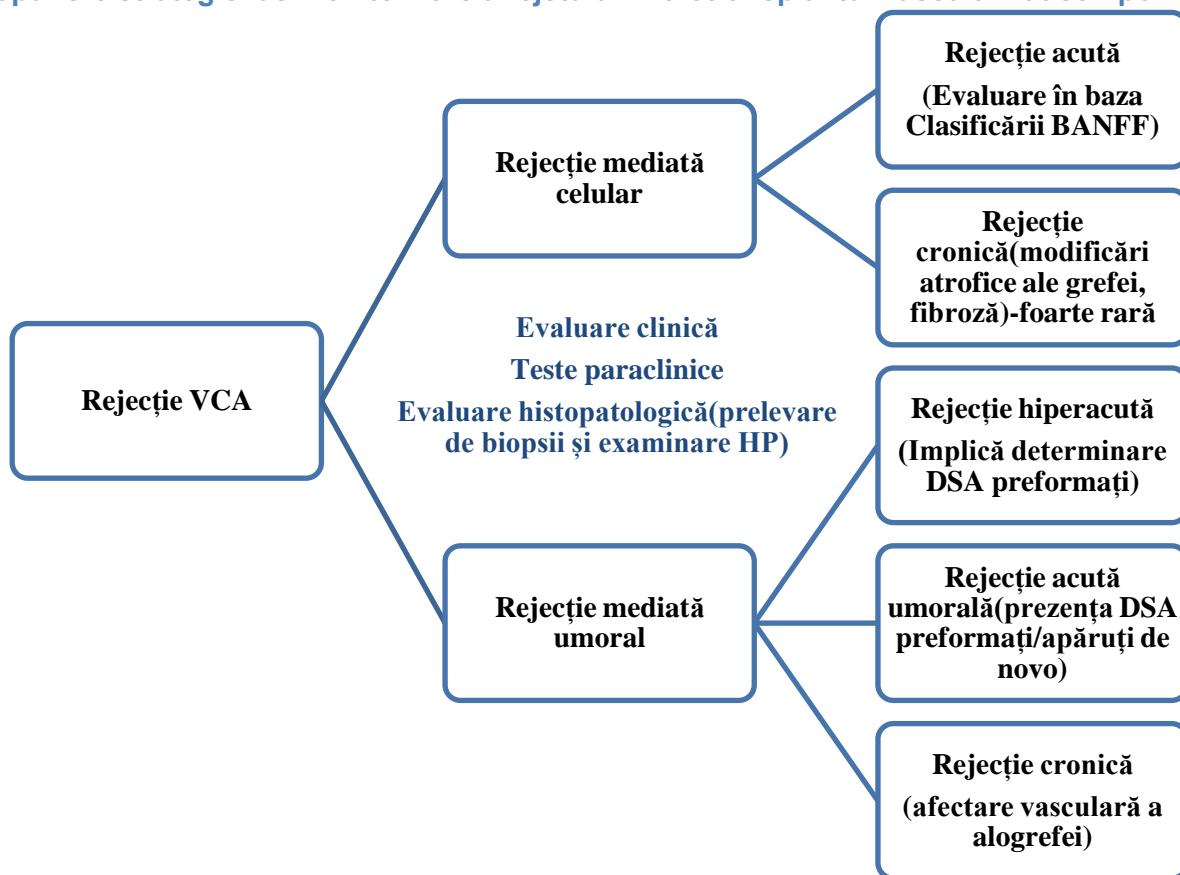
Minimizarea riscului de apariție a sindromului de ischemie reperfuzie scade incidența de rejecție acută a alogrefei, reduce severitatea unei rejecții cronice și îmbunătățește rezultatele clinice ale transplantului. Astfel, este plauzibil ca o protecție mai bună împotriva stresului oxidativ și ischemiei-reperfuziei consecutive diminuează răspunsurile pro-inflamatorii ce pot apărea în țesuturile heterogene din componenta VCA , ameliorând răspunsul imun adaptativ al gazdei, ce altfel ar putea declanșa rejecția și ar duce la pierderea alogrefei.

Prevenția leziunilor de ischemie-reperfuzie este esențială în scăderea incidenței rejecției acute și a celei cronice, permițând promovarea unor strategii de inducere a toleranței imune cu scopul de scădere a dozelor medicației imunosupresoare.

10.6. Protocol de monitorizare a rejecției în alotransplantul vascularizat compozit

Am analizat principalele componente ale VCA, pentru a ilustra caracteristicile lor imunologice cât și comportamentul acestora în cazul alotransplantării ca și elemente individuale (alotransplanturi tisulare libere sau vascularizate). Ne-am bazat pe experiența clinicii noastre în utilizarea clinică a alogrefelor tegumentare cât și pe activitatea experimentală prealabilă în domeniu, de asemenea am deprins, cu permisiune, protocolul de utilizare a alogrefelor tegumentare al Spitalului UZ Leuven din Belgia. Am sintetizat de asemenea datele reprezentative din literatura referitoare la caracterizarea antigenică a fiecărei componente VCA, scopul final fiind de a formula un protocol de monitorizare a rejecției ce va putea fi utilizat în cadrul clinicii noastre.

Propunere strategie de monitorizare a rejetului în alotransplantul vascularizat compozit



Monitorizarea rejetului în VCA este o activitate complexă, ce necesită o colaborare stransă interdisciplinară între chirurgul reconstructiv de transplant, imunolog și medicul anatomo-patolog. Este recomandabilă menținerea aceleiași componente a echipei medicale, pentru a se obține rezultate diagnostice și terapeutice cât mai bune.

Protocol monitorizare rejecție VCA	Detalii
Evaluarea clinică	<p><u>Examen clinic general atent efectuat, multidisciplinar (pacienți imunosupresați)</u></p> <p><u>Evaluare alogrefă:</u></p> <p>Edem</p> <p>Modificări tegumentare: eritem cu intensitate variabilă, difuz sau focal, discromii, macule, papule, noduli, aspect lichenoid în rejecție avansată, +/- durere</p> <p>Modificările fanerelor: onicomadeza, descuamări, hipotrofie/atrofie</p> <p>Modificări mucoase (alogrefe ce includ mucoase): eritem, ulceratii</p> <p>Palparea pulsurilor</p> <p>Evaluare ganglioni regionali</p>
Evaluarea paraclinică	<p>Bilant clinic general: analize de sânge (hemoleucograma, biochimie, coagulare), sumar de urină, radiografie toracică, ecografie abdominală, EKG.</p> <p>Examinare detaliată aparat/sistem în cazul unor acuze clinice</p>

	<p>Evaluarea alogrefei:</p> <p>-evaluare imagistică: radiografia segmentului, examen ecografic(ecografii de părți moi, evaluarea stațiilor ganglionare, ecografie Doppler venos și arterial); CT, RMN, angiografie; angio-CT, angio-RMN-foarte utile dacă sunt disponibile, EMG, RMN funcțional</p> <p>-evaluare dermatologică: dermatoscopie</p> <p>Testări imunologice: testări anticorpi anti-HLA și non-HLA, evaluarea funcțională a limfocitelor T, biomarkeri ai rejecției, evaluare chimerism</p> <p>Dozări serice medicație imunosupresoare</p> <p>Testări pentru complicații infecțioase(virale, bacteriene, fungice)</p>
Evaluare histo-patologică	Prelevarea biopsiilor de la nivelul alogrefei și grefei de piele santinelă și examinare histopatologică; pentru raportarea rezultatelor și conducerea terapiei se utilizează Clasificarea "Banff 2007 a alogrefelor compozite ce au componentă tegumentară", standardul internațional în domeniu
Regularitatea monitorizării	Primele 14 zile post-transplant:evaluare zilnică clinică(examen general și local), analize de sânge,testări imunologice(determinări de anticorpi, dozare medicație imunosupresoare)
	Ulterior: evaluare săptămânală în prima lună, lunară în primele 3 luni, ulterior din 3 în 3 luni sau la indicație (pacientul este educat să își inspecteze atent alogrefa, zilnic, și să se prezinte la centrul unde a fost transplantat/serviciul teritorial avizat) în cazul în care observă orice modificare, chiar și minoră la nivelul acesteia sau în situația apariției unei simptomatologii sistemice.

Grupul de consens în alotransplantul de țesuturi compozite a formulat recomandările de prelevare a biopsiilor necesare monitorizării rejecției în VCA[22]:

- se recoltează o probă bioptică de 4 mm de la nivelul pielii afectate, în zona de eritem și indurație maximă;
- proba prelevată trebuie să includă epiderm, anexe, derm, țesut subcutanat și vase sangvine;
- colorare cu Hematoxilina-eozina și PAS(periodic acid–Schiff)

Următorul tabel redă "Clasificarea Histopatologică Banff 2007 a alogrefelor compozite ce au componentă tegumentară[10]:

Gradul 0		Absente/rare infiltrate inflamatorii
Gradul I	Rejecție acută ușoară	Infiltrat perivascular în cantitate mică; fără afectarea epidermului supraiacent
Gradul II	Rejecție acută moderată	Inflamație perivasculară moderată spre severă+/- afectare ușoară a epidermului sau anexelor(limitată la spongioză și exocitoză); fără apoptoză sau discheratoză epidermală
Gradul III	Rejecție acută severă	Inflamație densă și afectare epidermală cu apoptoză epitelială, discheratoză+/-keratinoliză
Gradul IV	Rejecție acută fază necrotică	Necroză francă a epidermului sau a altor structuri ale pielii

În cadrul discuțiilor aferente acestui capitol am urmărit particularitățile rejetului în alotransplantul vascularizat compozit, analizând amănunțit aspectele ce pot conduce la recunoașterea inadecvată a mecanismelor, modului de prezentare clinic și histopatologic a variatelor episoade de rejecție din cadrul VCA.

10.7. Propunere Protocol Terapeutic Imunosupresor în Alotransplantul Vascularizat Compozit

Propunem un protocol schematic de imunosupresie în alotransplantul vascularizat compozit, în baza recomandărilor existente în cadrul Societății Internaționale de Alotransplant Vascularizat Compozit (ISVCA), Societății Mondiale de Transplant (TTS), adaptându-ne în funcție de agenții terapeutici existenți în prezent în România în cadrul Programului național de transplant de organe, țesuturi și celule de origine umană (P9-în cadrul Programelor Naționale de Sănătate), stipulați prin legislația în vigoare (act de bază : Hotărârea Guvernului nr. 720/2008, cu modificările ulterioare). Dozele terapeutice de referință sunt cele recomandate de Agenția Europeană a Medicamentului (EMA) și Agenția Națională a Medicamentului. Acestea trebuie adaptate în funcție de necesitățile și comorbiditățile fiecărui pacient, de către echipa medicală multidisciplinară de transplant (chirurg plastician, imunolog, medic internist). [42, 48-50]

Protocol Terapeutic Imunosupresor în Alotransplantul Vascularizat Compozit		
Faza Terapie de inducție	Caracterizare Debutează pretransplant Administrare anticorpi monoclonali sau policlonali	Agenți Terapeutici Anti-timoglobulină: Thymoglobuline Imunoglobulină (iepure) anti-timocite umane pulbere pentru soluție perfuzabilă, 5 mg/ml Doze: 1.5mg/kgc/zi timp de 9 zile <i>sau</i> Basiliximab (Simulect) Doza totală recomandată la adulți 40 mg; administrarea fiind făcută în 2 prize: 20 mg cu 2 ore pre-transplant, a doua priză de 20 mg fiind administrată la 4 zile post-transplant. <i>sau</i> Alemtuzumab (Campath) Necesită completarea unor formulare suplimentare pentru acordare către un grup farmaceutic european specializat

Terapia de menținere	Administrarea începe peritransplant cu doze foarte mari ale agenților terapeutici, doze crescute se mențin în perioada inițială post-transplant, urmând a fi reduse progresiv către perioada cronică de menținere	<p style="text-align: center;"><u>Tripla terapie medicamentoasă:</u></p> <p>1. Tacrolimus(Prograf) Dozele se ajustează post-transplant în funcție de nivelele serice/tacrolinemia pentru menținerea acestuia la valorile următoare: Prima săptămână: 15-20 ng/ml Primele 2 luni: 12-15 ng/ml Primul an: 8-12 ng/ml După primul an:5-8 ng/ml</p> <p style="text-align: center;"><i>sau</i></p> <p style="text-align: center;">(înlocuire doar în cazuri rare, la indicații specifice)</p> <p>Sirolimus(Rapamune), soluție orală, 1g/ml, Doze variabile pentru a menține un nivel seric de 6-7ng/ml</p> <p style="text-align: center;"><i>și</i></p> <p>2. Micofenolat mofetil(Cellcept) Administrare în prima zi posttransplant intravenos, ulterior administrare orală 1-1.5 g x2/zi(în total 2-3 g/zi)</p> <p style="text-align: center;"><i>și</i></p> <p>3. Corticoterapie Administrare intravenoasă metilprednisolon 1g în timpul intervenției chirurgicale de transplant, schema administrării intravenoase continuând posttransplant, în zilele următoare astfel: Ziua 1: 50 mgx4/zi(la 6 ore fiecare administrare) Ziua 2:40 mgx4/zi Ziua 3: 30 mgx4/zi Ziua 4: 20 mgx4/zi Ulterior, după ziua 5: administrare orală Prednison 30 mg/zi pentru încă 15 zile, apoi reducerea progresivă a dozelor(scăzând săptămânal 2.5 mg din doza zilnică de prednison), până se ajunge la 10 mg/zi. Dacă evoluția este favorabilă, se poate continua cu ajustarea corticoterapiei la aproximativ 5-7.5 mg/zi. Scopul pe termen lung: eliminarea cortizonului din schema terapeutică</p>
-----------------------------	---	--

Tratamentul episoadelor de rejet va fi stabilit de către echipa medicală a centrului de transplant, în funcție de fiecare caz în parte și include următoarele strategii terapeutice:

- puls-terapie corticosteroidiană;
- creșterea dozelor de tacrolimus;
- administrare Thymoglobuline timp de o săptămână ;
- aplicare topice imunosupresoare;
- măsuri specifice în cazurile de rejecție refractară terapeutic/cauzalitate specificată(plasmaferază, administrare de anticorpi de exemplu Rituximab).

Durata tratamentului episodului de rejet este dictată de răspunsul la terapie, cu remiterea manifestărilor clinice și confirmarea histopatologică a evoluției favorabile.

11. Strategii pro-tolerogenice in alotransplantul vascularizat compozit

A. ACTIVITATE EXPERIMENTALĂ

11.1. Prezentarea activității experimentale: studii imunologice în alotransplantul vascularizat compozit

11.1.1. Introducere

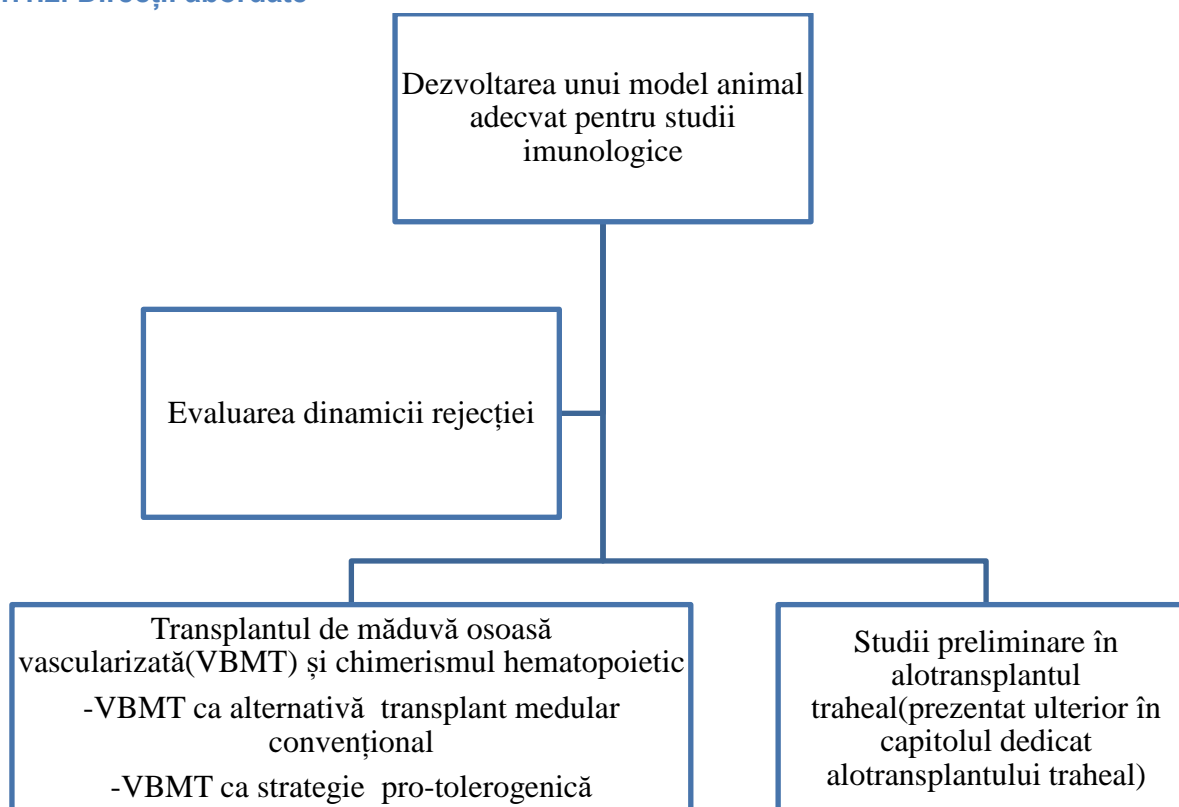
În cadrul proiectului doctoral, am efectuat și o parte de activitate experimentală, modelul animal ales fiind șobolanul de laborator. În cadrul studiului experimental, am urmărit familiarizarea cu tehnicile microchirurgicale în transplantul de țesuturi compozite și evaluarea aspectelor imunologice importante: evaluarea dinamicii rejecției, testarea protocoalelor de imunosupresie și inducere a toleranței imunologice.

Într-o prima etapă am vizat stabilirea modelului experimental adecvat pentru studiile imunologice, implicând modele cât mai simple de transplanturi vascularizate compozite, pentru a reduce timpul operator, morbiditatea și mortalitatea animalului de experiență și a putea evalua rezultatele pe termen lung ale protocoalelor imunologice aplicate. Pe modelele experimentale stabilite se pun în aplicare protocoalele de imunosupresie și inducere a toleranței imune.

Înainte de începerea activității experimentale propriu-zise, s-a impus o riguroasă activitate de documentare, elaborarea protocoalelor de lucru, achiziția animalelor de laborator și a consumabilelor necesare. Animalele de laborator provin de la biobaze autorizate.

Operațiile și urmărirea postoperatorie a animalelor pe durata studiului s-a efectuat în Laboratorul de Microchirurgie Experimentală al Clinicii de Chirurgie Plastică și Microchirurgie Reconstructivă a Spitalului Clinic de Urgență București.

11.1.2. Direcții abordate



11.2. Dezvoltarea unui model animal adecvat pentru studii imunologice

Material si metoda

Au fost analizate mai multe modelele chirurgicale de alotransplant de membru pelvin la șobolan: transplant ortotopic, heterotopic și transplantul unui lambou osteomiocutan. De asemenea au fost evaluate modelele chirurgicale de alotransplant de lambou epigastric și alotransplant de perete abdominal. Alotransplanturile vascularizate compozite au fost efectuate între șobolani donori Brown Norway și primitori Lewis. Monoterapia cu Ciclosporina A în doza de 16 mg/kg corp a fost utilizată pentru prevenirea rejecției. În câteva cazuri, am utilizat modelele singenice de alotransplant, între șobolani aparținând aceleiași rase, cu scopul familiarizării cu tehnicile chirurgicale.

Procedeu chirurgical	Descriere	Număr de intervenții
Alotransplant ortotopic de membru pelvin	Prelevare la nivel trans-femural	3
Alotransplant heterotopic de membru pelvin (prelevat parțial)	Zona receptoare-regiune dorsală a șoldului primitorului	7
Alotransplant heterotopic al întregului membru pelvin	Regiunea inghinală a primitorului (model singenic)	1
Alotransplantul de lambou osteomiocutan	Componentă osoasă: femurul	7
	Transplant de genunchi	2

	Transplant de gambă	2
Transplant de lambou epigastric	Model singenic	4
Ridicare lambou de hemi-perete abdominal	Toată grosimea: toate straturile peretelui abdominal	4

Au fost descrise amănunțit procedeele chirurgicale de alotransplant efectuate la animalele de experiență.

Pentru a evalua care dintre cele trei modele de transplant bazat pe vasele femurale(transplantul ortotopic, heterotopic și lamboul osteomiocutan) este mai potrivit pentru studiile imunologice am analizat 3 grupuri experimentale:

- Grupul 1: alotransplant ortotopic de membru pelvin(n=3);
- Grupul 2: alotransplant heterotopic parțial de membru pelvin(n=7);
- Grupul 3: alotransplant de lambou osteomiocutan femural(n=7).

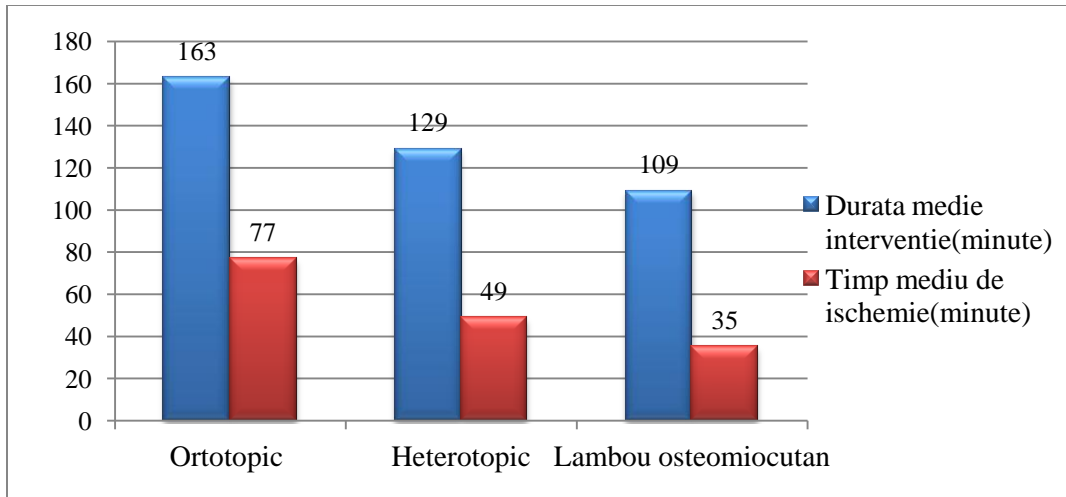


Toate alotransplanturile s-au realizat între șobolani donori Brown Norway și primitori Lewis, ce au fost tratați în condiții standardizate. Intervențiile chirurgicale au fost efectuate de aceeași echipă operatorie, urmând un protocol prestabilit. Imunosupresia postoperator a fost asigurată prin administrarea de Cyclosporina A (CsA), în doză de 16 mg/kg.

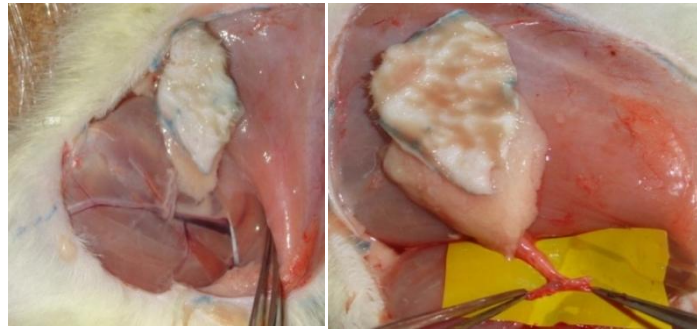
Am urmărit evaluarea parametrilor obiectivi ce țin de tehnica chirurgicală: am comparat duratele intervenției chirurgicale și a timpului de ischemie pentru fiecare tip de procedură.

Rezultate

Graficul următor redă duratele medii ale intervenției și timpul mediu de ischemie, observându-se valorile cele mai scăzute în cazul alotransplantului lamboului osteomiocutan:



A fost analizat și modelul de transplant al lamboului epigastric, ridicat de la șobolanul donator și bazat pe vasele femurale :



O altă direcție promițătoare este utilizarea unui model chirurgical reprezentat de alotransplantul de perete abdominal la șobolan. Am exersat prelevarea unui lambou hemiabdominal, toată grosimea peretelui, la șobolan. Lamboul este ridicat, după secționarea ligamentului inghinal, bazându-ne pe vasele iliace externe, cu prezevarea de circumflexe iliace și epigastrice inferioare:





Discutii

În urma analizei efectuate putem observa avantajul utilizării alotransplantului lamboului compozit osteomiocutan, comparativ cu celalate modele studiate (în special cu transplantul ortotopic de membru pelvin) pentru studiile imunologice efectuate în domeniul transplantului tisular compozit, eliminând etape dificile tehnice din cadrul intervenției chirurgicale, cu reducerea duratei intervenției și a timpului de ischemie și evitând complicațiile ce pot apărea în urma procedurilor chirurgicale mai laborioase. Componenta osoasă intactă păstrează micromediul măduvei osoase, cu rol esențial în imunomodulare.

Când nu se vizează urmărirea rolului imunomodulator al componentei osoase pentru studiile imunologice, o variantă foarte utilă de model experimental este reprezentată de alotransplantul lamboului epigastric. Este un model util datorită componentei sale tegumentare (intens antigenică), ce permite monitorizarea vizuală a rejecției, aprecierea intensității acesteia și posibilitatea prelevării de biopsii pentru examenul histopatologic.

Lamboul epigastric bazat pe vasele epigastrice superficiale sau vasele femurale este considerat și în cadrul publicațiilor din literatură un model de transplant mai simplu, asociat cu rate mici de mortalitate. Dezavantajul acestui lambou este suprafața relativ mică a insulei cutanate.[51]

O alternativă când se dorește obținerea unei alogrefe de mari dimensiuni este alotransplantul de perete abdominal la șobolan. Acest model își are utilitatea în studiile imunologice prin componenta sa tegumentară întinsă, cu încărcătură antigenică mare, permițând o bună evaluare a dinamicii rejecției și răspunsul la diferite protocoale de inducere a toleranței imune, precum și datorită particularităților histologice a stratigrafiei peretelui abdominal.[52, 53]

Disecția lamboului este foarte laborioasă, fiind un model experimental cu dificultate tehnică ridicată, necesitând timp operator mai lung (implicit a dozelor anestezice utilizate) - situație ce se asociază cu morbiditate crescută și risc de mortalitate a animalului. Necesitatea unui astfel de model experimental complex este justificată de posibilitatea evaluării cu mai mare acuratețe a dinamicii rejecției, întrucât la nivelul lamboului sunt prezente toate straturile componente ale peretelui abdominal.

11.3. Evaluarea dinamicii rejecției în modelul experimental de alotransplant ortotopic de membru pelvin la șobolan

Monitorizarea rejecției în alotransplantul vascularizat compozit este esențială pentru acuratețea studiilor imunologice din acest domeniu. Urmărirea vizuală zilnică a membrului transplantat este cea mai la îndemână metodă pentru depistarea rejecției încă din stadii incipiente, pentru validarea

episodului de rejet bazându-ne însă pe diagnosticul histopatologic. Colectivul clinicii noastre a efectuat în prealabil o intensă activitate de cercetare în această direcție, datele fiind publicate în literatura de specialitate, elaborând o scală de monitorizare a rejetului în alotransplantul vascularizat de membru pelvin la șobolan, standardizând atât observațiile clinice cât și cele histopatologice. [54, 55]

Am aplicat scalele respective de evaluare și în studiile experimentale efectuate în cadrul proiectului doctoral.

11.4. Transplantul de măduvă osoasă vascularizată (VBMT) și chimerismul hematopoietic: studii experimentale

Componenta osoasă din cadrul alogrefelor vascularizate compozite reprezintă un mediu unic, particular acestui tip de alotransplant, conținând atât suportul scheletal cât și două tipuri de populații celulare: celulele medulare și celulele stromale. Interacțiunile celulare de la nivelul acestui micromediu par să aibă un rol determinant în imunomodularea după alotransplantul vascularizat compozit.

Două direcții de cercetare au fost abordate în relație cu alotransplantul măduvei osoase vascularizate:

- utilizarea alotransplantului măduvei osoase vascularizate ca alternativă la transplantul medular convențional (transplantul componentei celulare medulare), ce reprezintă terapia standard în o multitudine de afecțiuni maligne și non-maligne
- alotransplantul măduvei osoase vascularizate ca strategie pro-tolerogenică: evaluarea rolului chimerismului hematopoietic în obținerea toleranței imunologice

11.4.1. Transplantul măduvei vascularizate ca alternativă la transplantul celular convențional de măduvă osoasă

11.4.1.1. Introducere

Alotransplantul convențional de măduvă osoasă reprezintă terapia standard a numeroase afecțiuni hematologice, genetice și autoimune. Există o serie de riscuri asociate transplantului medular convențional (necesitatea administrării protocoalelor mieloablativă asupra gazdei, riscul de eșec al grefării, riscul apariției bolii grefă contra gazdă, risc infecțios, recidivă tumorală), fapt ce a dus la căutarea de noi alternative terapeutice, alotransplantul variantei vascularizate a măduvei osoase fiind una dintre acestea.

Scopul acestui studiu a fost urmărirea dezvoltării microchimerismului după alotransplantul măduvei vascularizate (VBMT) comparativ cu transplantul medular convențional (BMT). Studiul a fost efectuat în cadrul proiectului "POSTDOC-TRANSPLANT", 2010-2013, Contract POSDRU/89/1.5/S/64153, cu participare multidisciplinară (chirurgie plastică, hematologie, laborator biologie moleculară), rezultatele fiind publicate în literatura de specialitate. [56]

11.4.1.2. Material și metodă

Au fost incluși în studiu 25 de șobolani, alcătuind 3 grupuri experimentale:

- grupul 1(n=10)-transplant de măduvă vascularizată(șobolanii Lewis au primit un transplant heterotopic de membru pelvin de la donatori Brown Norway, alogrefa fiind poziționată în regiunea dorsală a primitorului.);
- grupul 2(n=10)-transplant celular convențional de măduvă osoasă(șobolanii Lewis au primit, prin administrare intravenoasă, o suspensie celulară conținând 5×10^7 celule ale măduvei osoase provenite de la șobolanii donori Brown Norway)



- grupul 3(n=5), de control-șobolani Lewis netratați.

Toți șobolanii Lewis au primit terapie imunosupresoare standard, constând în ciclosporina A în doza de 17mg/kgc, timp de 60 de zile.

La 30 și 60 de zile post-transplant, au fost prelevate probe din sângele periferic, măduva osoasă a primitorului și măduva osoasă a membrului alotransplantat de la donator. Celulele provenite de la donator au fost identificate în țesuturile primitorului prin utilizarea citometriei în flux.

11.4.1.3. Rezultate

În grupul 1, analiza microchimerismului celular a demonstrat prezența celulelor provenite de la șobolanii Brown Norway la primitorii Lewis atât la 30 zile cât și 60 zile post-transplant:

Momentul testării	Sânge periferic primitor	Măduva osoasă primitor	Femur alotransplantat de la donator
30 zile	5.3%±4.3%	0.6%±0.3%	28.5%±2.9%
60 zile	3.3%±5.1%	1.9%±0.7%	1.7%±3.3%

În grupul 2 numărul celulelor de la donator a fost foarte scăzut la 30 și 60 de zile. Diferența între cele două grupuri a fost considerată semnificativă statistic, valoarea $p < 0.005$, demonstrându-se o grefare celulară mai bună după transplantul heterotopic de membru(măduvă vascularizată) comparativ cu transplantul celular convențional medular.

11.4.1.4. Discuții

Prin acest studiu s-a putut observa că celulele provenite de la nivelul măduvei vascularizate alotransplantate ca și componentă a transplantului heterotopic de membru pelvin, migrează la nivelul țesuturilor primitorului, putând fi detectate la nivelul acestora la 30 și 60 zile post-transplant, în prezența monoterapiei imunosupresoare cu Ciclosporina A. Prezența unui număr mare de celule provenite de la donator în sângele primitorului, sugerează o descărcare continuă a elementelor celulare de la nivelul alogrefei vascularizate.

VBMT menține atât componentele celulare hematopoietice cât și componenta stromală, păstrează neschimbată arhitectura medulară, asigurând un micromediu adecvat, permițând grefarea imediată atât a celulelor mature cât și a celor progenitoare imediat după transplant.

11.4.2. Transplantul măduvei vascularizate ca strategie de inducere a toleranței imunologice în alotransplantul vascularizat compozit

11.4.2.1. Alotransplantul simultan de membru pelvin și femur contralateral la șobolan

Scop

Scopul acestui studiu a fost de a analiza prin comparație dezvoltarea microchimerismului în cazul alotransplantului ortotopic de membru pelvin la șobolan, efectuat ca procedeu unic, asociat cu transplant convențional medular(infuzie celulară) sau asociat cu alotransplantul de măduvă vascularizată(transplant femural vascularizat)

Material și metodă

S-au efectuat alotransplanturi vascularizate compozite între șobolanii Brown Norway(donatori) și Lewis(primitori). Trei grupuri experimentale au fost testate:

- Grupul 1(n=5): alotransplant ortotopic de membru pelvin(Tx);
- Grupul 2(n=5): alotransplant ortotopic de membru pelvin+transplant convențional de măduvă osoasă(Tx+BMC);
- Grupul 3(n=5): alotransplant ortotopic de membru pelvin+transplant de măduvă osoasă vascularizată(Tx+VBMT)

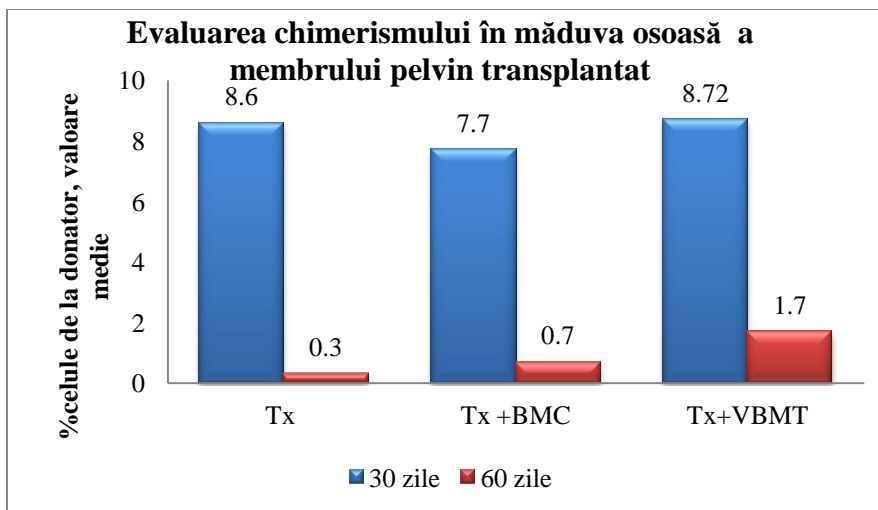
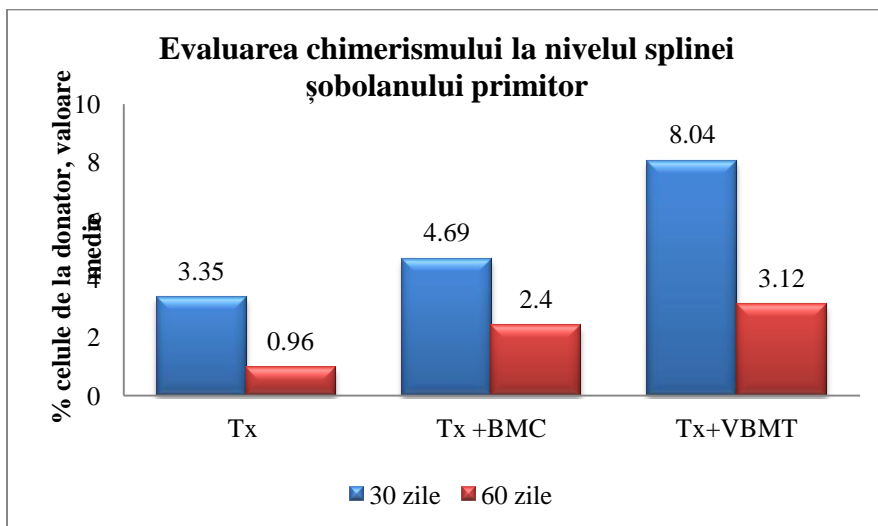
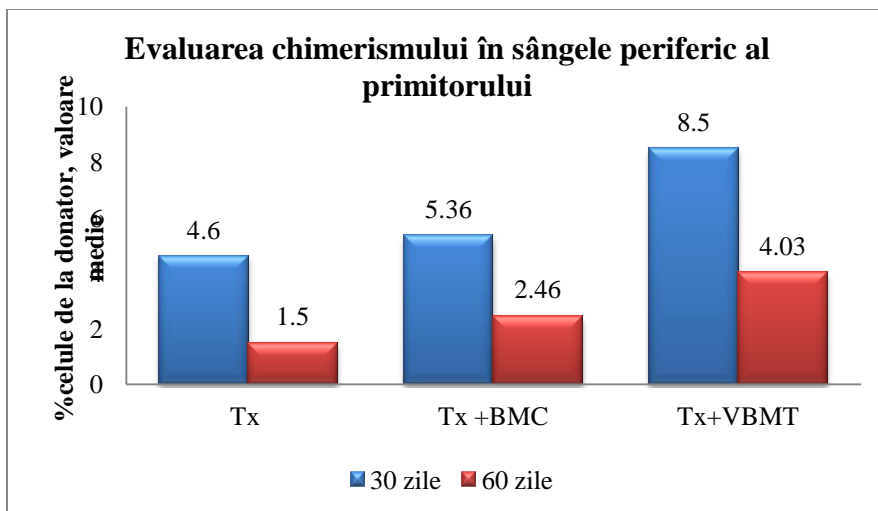
Șobolanii primitori Lewis au primit terapie imunosupresoare standard, constând în ciclosporina A în doza de 17mg/kgc, timp de 60 de zile.

Tehnicile chirurgicale aferente grupurilor 1 și 2 au fost prezentate în detaliu în capitolele precedente. Grupul 3 experimental a constat în 5 proceduri de alotransplant simultan de membru pelvin și lambou osteomiocutan femural între șobolanii Brown Norway și Lewis:



Rezultate

A fost evaluat chimerismul în sângele periferic, organele limfoide(splina), în măduva osoasă a membrului pelvin transplantat, cât și la nivelul lamboului osteomiocutan femural(în cazul grupului 3 experimental), la 30 și respectiv 60 de zile post-transplant, obținându-se următoarele seturi de rezultate:



Procentul de celule de la donator la nivelul lamboului osteomiocutan femural a fost de 43.8% la 30 de zile și de 1.5% la 60 de zile post-transplant. Nu s-a observat apariția bolii grefă-contra-gazdă la animalele incluse în studiu.

11.4.2.2. Transplantul simultan de hemifață și măduvă vascularizată la șobolan

Studiul a fost efectuat în cadrul proiectului multidisciplinar POSDRU/89/1.5/S/64153. (POSTDOC-TRANSPLANT) iar rezultatele comunicate în cadrul comunității științifice de specialitate. [57]

Scop

Scopul a fost evaluarea rolului măduvei vascularizate(alotransplant femural) în a induce toleranța funcțională în alotransplantul facial la șobolan, efectuat împotriva unei bariere majore de histocompatibilitate, între șobolanii Brown Norway și Lewis.

Material și metodă

Două grupuri experimentale, însumând 10 procedee de alotransplant compozit au fost incluse în studiu. Primul grup (n=5) a constat în transplantul hemifacial concomitent cu transplantul alogrefei femurale (alotransplantul lamboului osteomiocutan) la șobolan, iar al doilea grup, de control (n=5) a primit doar alotransplant facial. Șobolanii Lewis primitori ai transplantului au primit tratament imunosupresor cu Ciclosporina A, în doze de A 16 mg/kg/zi în prima săptămână. Ulterior dozele au fost scăzute progresiv, ajungându-se la 2 mg/kg/zi la 4 săptămâni post-transplant.

Rezultate

S-a observat o evoluție clinică net favorabilă în cazul alotransplanturilor simultane hemifață-femur în comparație cu grupul de control ce a primit doar alotransplant hemifacial, sub tratamentul imunosupresor administrat(monoterapia cu Ciclosporina A în doze descrescătoare progresiv). Intervalul de apariție a semnelor rejetei a fost mai lung în cadrul primului grup experimental.

Alotransplantul de măduvă vascularizată a permis supraviețuirea alogrefelor hemifaciale în prezența unor doze imunosupresoare reduse, permițând obținerea unui status de toleranță imunologică parțială în grupul cu transplant simultan hemifață-lambou osteomiocutan femural.

11.4.2.3. Transplantul de măduvă vascularizată la primitori condiționați prealabil. Studii experimentale preliminare: Elaborare protocol de condiționare a primitorilor

Scopul elaborării și testării unui protocol de condiționare a primitorilor transplantului este inducerea chimerismului hematopoietic robust, ce ar permite supraviețuirea alogrefelor vascularizate compozite în absența terapiei imunosupresoare.

Ilustrăm în continuare modalitatea condiționării pre-transplant a șobolanilor, utilizând un protocol de iradiere corporală totală, dezvoltat în parteneriat cu Spitalul Clinic Colțea(în cadrul proiectului POSDRU 64153). Au fost utilizați în cadrul acestor studii preliminare șobolani Brown Norway, fiind recunoscuți ca o rasă robustă, rezistentă(comparativ cu șobolanii Lewis, mai sensibili și susceptibili la complicații).



Condiții de iradiere

Dispozitiv: Primus(Siemens)

Energie: 6 MeV

Camp: 30x22

A.P: 600 cGy/300 cGy/camp

D=0.786 cGv/min

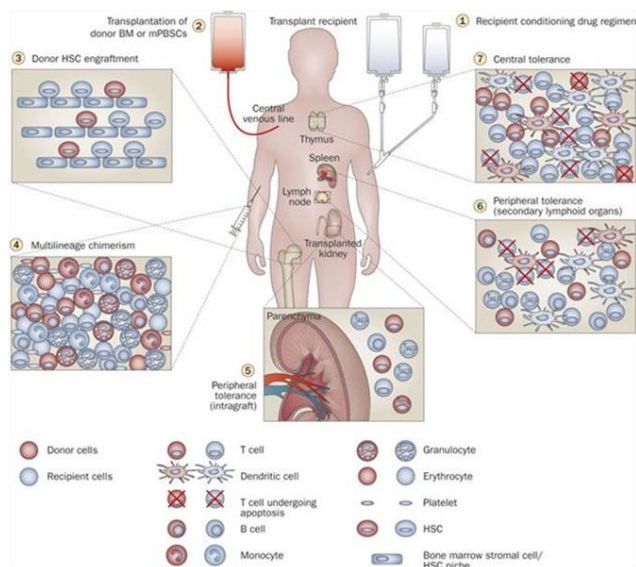
11.4.2.4. Discuții asupra strategiilor imunomodulatorii bazate pe inducerea chimerismului

În cadrul studiilor efectuate de echipa noastră pe model experimental, asupra rolului protolerogenic al alotransplantului de măduvă vascularizată, am urmărit evaluarea nivelurilor microchimerismului hematopoietic și posibilitatea inducerii toleranței imunologice la primitorii transplanturilor.

Studiul comparativ al celor trei grupuri experimentale la șobolan, incluzând alotransplantul de membru pelvin efectuat ca alogrefă unică, asociat cu transplantul celular convențional de celule medulare și cotransplantul femurului contralateral a relevat un nivel ridicat al microchimerismului în grupul experimental ce asociază transplantul de membru pelvin și transplantul femural bilateral, atât la 30 zile cât și la 60 de zile în sângele periferic, splina primitorului cât și în măduva osoasă a membrului pelvin transplantat. Prin asocierea transplantului femural contralateral a fost crescută cantitatea de măduvă osoasă transplantată, prezervând structura acesteia. O cantitate mai mare de celule a fost administrată și în cadrul grupului experimental ce a primit transplant celular convențional medular concomitent transplantului de membru pelvin, și în cadrul acestui grup observându-se obținerea unor valori medii mai ridicate ale chimerismului hematopoietic în comparație cu alotransplantul ortotopic de membru efectuat ca procedeu unic. În toate cele 3 grupuri nivelurile de chimerism au fost mai ridicate la 30 zile decât la 60 zile. Rezultate similare au fost raportate și în literatura de specialitate.[58]

În asocierea VBMT la alotransplantul hemifetei la șobolan s-a obținut acceptarea alogrefei cu posibilitatea reducerii progresive a dozilor terapeutice imunosupresoare, această situație putând fi considerată un status de toleranță imunologică parțială în cadrul modelului experimental propus.

Inducerea chimerismului mixt la primitor este până în prezent abordarea cea mai studiată pentru a obține toleranța imunologică în transplant. Am urmărit, în cadrul transplantului de organe solide unde experiența clinică este mult mai vastă în comparație cu domeniul VCA, datele existente în literatura(studii relevate din 3 centre mari din SUA) referitoare la inducerea toleranței imunologice în transplantul renal(acestea fiind similare imunologic cu situația VCA).După cum reiese din figura următoare, prima etapa este cea a condiționării primitorului, citoreducția fiind realizată prin administrare de Fludarabina, Ciclofosfamida sau iradiere timitică. Urmează transplantul de măduvă osoasă sau cu celule medulare din sângele periferic. După grefarea celulelor se obține chimerismul tuturor liniilor celulare, ce poate fi tranzitor sau durabil. Ideal, ulterior se dezvoltă toleranța periferică la nivelul alogrefei și în organele limfoide secundare și de asemenea toleranța centrală[59]:



(Pilat N., Wekerle T., *Transplantation tolerance through mixed chimerism*, *Nature Reviews Nephrology*, 2010; 6, 594-605; Licență Nature Publishing Group Nr. 3941590538770)

Rezultatele acestor studii pot sta la baza viitoarelor strategii terapeutice și în cazul transplantului tisular compozit.

Inducerea unui chimerism mixt, dincolo de bariera complexului major de histocompatibilitate (MHC) atrage posibilitatea de a dezvolta reacție de tipul greafă contra gazdă (GvHD), ceea ce este o complicație de nepermis în inducerea toleranței pentru trasplantul VCA.

Soluția propusă de către echipele de cercetare este terapia celulară bazată pe celulele T reglatorii, capabile să susțină chimerismul mixt. Terapia cu Tregs permite dezvoltarea chimerismului mixt și a toleranței, fără a fi nevoie de regimuri de condiționare agresive. O abordare optimă include obținerea într-o prima fază a unei toleranțe parțiale ce permite reducerea dozelor imunosupresoare spre a scădea toxicitatea, sau menținerea cu monoterapie imunosupresoare. [60]

Un protocol ce s-a dovedit eficient pentru a obține imunomodulare în alotransplantul de membru toracic este cel al Universității din Pittsburgh, ce constă în administrarea în vederea imunomodulării a unei suspensii celulare medulare obținută de la nivelul corpurilor vertebrale ale donatorului. Descoperirile au fost sugestive pentru un rezultat funcțional satisfactor, în comparație cu alte protocoale de transplant de mână, reducerea terapiei imunosupresoare de menținere a fost fezabilă, pacienții primind doar monoterapie de menținere cu Tacrolimus, scăzând reacțiile adverse ale imunosupresoarelor, dar păstrând viabilitatea alogrefei și de asemenea prevenind rejectia acesteia) [61, 62].

Del Bene și colaboratorii au raportat utilizarea unui protocol imunomodulator ce utilizează celule stem mezenchimale medulare, acest protocol fiind conform autorilor cel mai blând tratament imunosupresor existent la momentul respectiv în transplantul vascularizat compozit, fără complicații asociate acestuia. [63]

B. EVALUAREA TRANSLAȚIEI CĂTRE PRACTICA CLINICĂ A UNOR STRATEGII TERAPEUTICE NOI ÎN VCA: STUDII PRELIMINARE

11.5. Alotransplantul vascularizat de creastă iliacă: studiu preliminar anatomo-chirurgical

11.5.1. Introducere

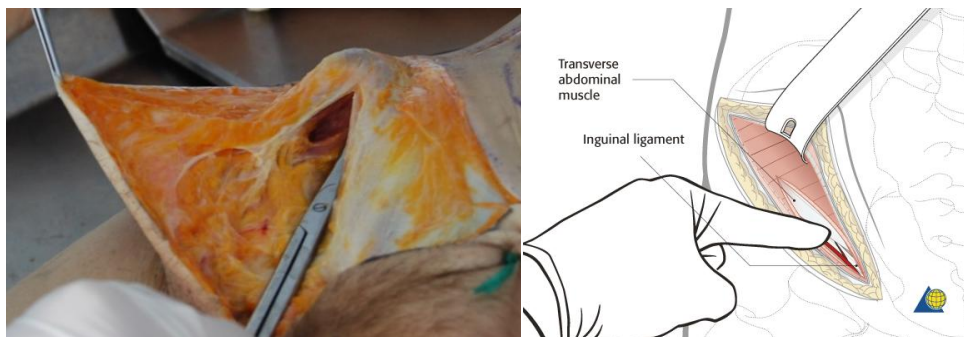
Sunt necesare investigații viitoare pentru a stabili aplicabilitatea clinică exactă a alotransplantului măduvei vascularizate, atât ca alternativă la transplantul medular convențional, cât și ca strategie pro-tolerogenică în cazul asocierii unui transplant de organ sau transplant vascularizat compozit.

Un situs donor potențial pentru astfel de intervenții este creasta iliacă. Potențiale utilizări viitoare ale alotransplantului vascularizat de creastă iliacă:

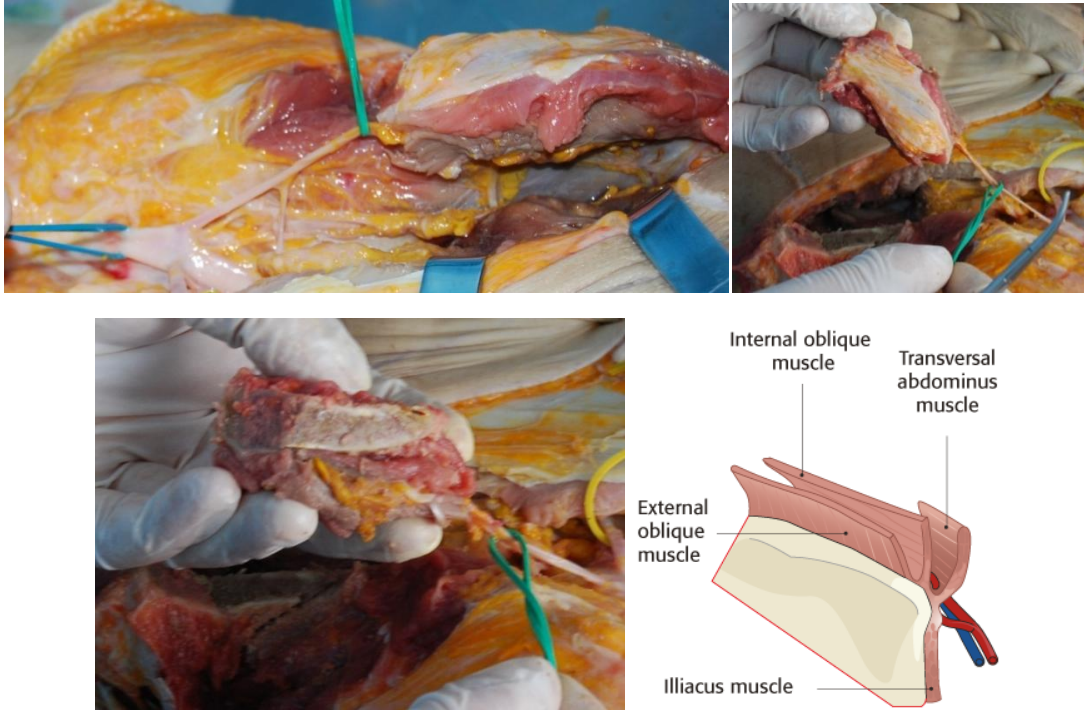
- reprezintă un procedeu acceptabil în cazul donatorilor în viață în transplantul medular, în cazul în care se va implementa utilizarea măduvei vascularizate ca alternativă la transplantul celular convențional;
- asocierea în alotransplanturile de organe pentru proprietățile imunomodulatorii;
- alotransplantul lamboului vascularizat de creastă iliacă se poate asocia unui alotransplant compozit fără componentă osoasă (transplantare simultană), pentru rolul imunomodulator medular;
- asocierea cu alotransplanturi vascularizate compozite ce prezintă componentă osoasă (transplant de membru toracic), pentru augmentarea componentei medulare și promovarea acceptării alogrefei.

11.5.2. Propunere protocol chirurgical de prelevare a lamboului vascularizat de creastă iliacă pentru utilizare în procedee de alotransplant

Am efectuat un studiu anatomo-chirurgical la cadavru proaspăt, cu scopul familiarizării cu procedeul chirurgical de ridicare a lamboului vascularizat compozit de creastă iliacă:



www.aofoundation.org (permisiune generală pentru uz științific)



www.aofoundation.org (permisiune generală pentru uz științific)



11.5.3. Discuții

În cadrul studiului efectuat am dovedit fezabilitatea chirurgicală a unui astfel de procedeu, încurajând cercetarea viitoare în direcția includerii alotransplantului de măduvă vascularizată pe lista protocoalelor clinice, cu variate utilizări potențiale-alternativă la transplantul medular convențional sau ca adjuvant(strategie pro-tolerogenică) în asociere cu alotransplanturile de organ sau de țesuturi compozite.

În cazul prelevării lamboului de la donator în moarte cerebrală sunt posibile adaptări tehnice menite să ușureze procedeu chirurgical și rezultatele pe termen lung. Un avantaj în acest sens ar fi prelevarea componentei osoase și tegumentare la dimensiunea maximă susținută de vascularizație, pentru a crește aportul de celule imunomodulatorii de la nivelul componentei osoase și a permite monitorizarea clinică și histopatologică a rejecției, prin intermediul componentei tegumentare. Un astfel de lambou osteomiocutan alotransplantat poate servi ca lambou santinelă în cazul alotransplanturilor de membru toracic, pentru a monitoriza rejecția, a preleva biopsii cutanate și a testa strategii terapeutice imunomodulatoare noi(evitând intervențiile

repetate la nivelul alotransplantului compozit funcțional,uneori greu acceptate de către pacient). La donatorul în moarte cerebrală, vasele circumflexe iliace profunde se pot diseca până la nivelul vaselor iliace externe, cu scheletizarea acestora și ridicarea lamboului pe un pedicul vascular cu calibru mai mare, pentru a ușura tehnic efectuarea anastomozelor(alegerea unei astfel de situații se adaptează și particularităților anatomice existente în zona primitoare a lamboului, în funcție de cum este planificată poziționarea alogrefei, lungimea pediculilor vasculari disponibili, experiența echipei medicale și dorința pacientului). De asemenea s-ar putea preleva concomitent și alte lambouri vascularizate cu componentă osoasă(femur, humerus,fibulă), pentru a crește cantitatea măduvei osoase cu proprietăți imunomodulatorii.

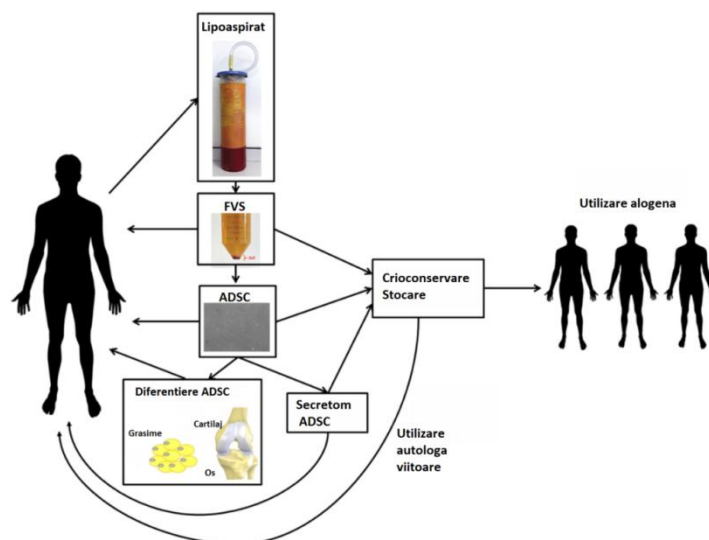
După cum am văzut într-un capitol precedent al tezei, metodele de investigație imagistică noi, cum este angio-computertomografia sunt extrem de utile în evaluarea corectă a teritoriilor vasculare și a arhitecturii tisulare regionale. Imaginile de mai jos redau aspectul angio-CT al regiunii inghinale stângi cu vizualizarea DCIA stânga, traiectului și modului de ramificație a acesteia:



Alotransplantul măduvei vascularizate pare o direcție de cercetare extrem de promițătoare, fiind necesară elaborarea unor protocoale chirurgicale standardizate cât și o colaborare strânsă cu laboratorul de biologie moleculară pentru a obiectiva rolul imunomodulator al componentelor celulare și stromale medulare.

11.6. Rolul imunomodulator al celulelor stem mezenchimale umane provenite din țesutul adipos: studii preliminare

Terapii celulare noi precum cele care folosesc celule mezenchimale derivate din măduvă osoasă (BM-MSCs) sau celulele adipoase (AD-MSCs sau ADSC), oferă date promițătoare în domeniul imunomodulării, ce ar putea fi aplicabile și în domeniul alotransplantului vascularizat compozit. Imaginea următoare redă procesul de izolare și producții cu potențial terapeutic rezultați din lipoaspirat: SVF și ADSC sunt în prezent utilizate în terapiile autologe și pot fi prezervate pentru uz ulterior, dar se consideră că acestea au potențial terapeutic și în cazul utilizării alogene; perspective terapeutice prezintă și ADSC diferențiate către o anumită linie celulară, cât și factorii secretați de ADSC(secretomul însumând totalitatea moleculelor secretate de ADSC)[64]:



(Modificat după Feisst V, Meidinger S, Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications*. 2015;8:149-162, Articol open access, Licența Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0))

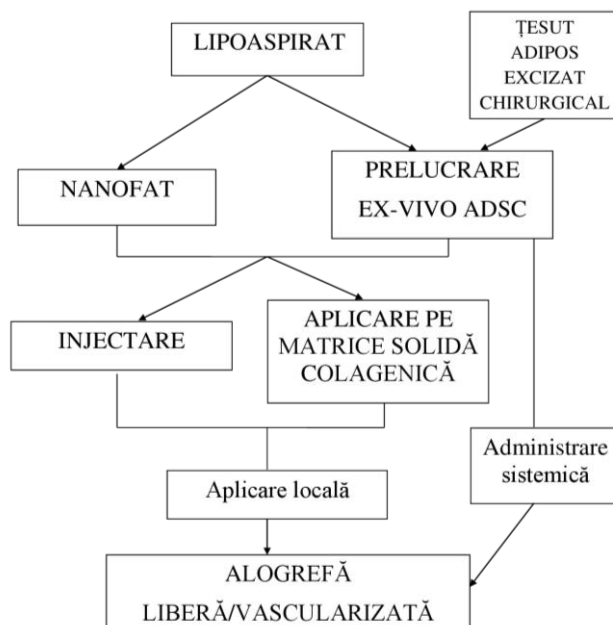
Am deprins protocolul de extragere a grăsimii, prin lipoaspirație și separare prin centrifugare în sistem închis steril, urmărit în cadrul programului de mobilitate internațională efectuat în spitalul UZ Leuven, Belgia, pașii acestuia fiind ilustrați în cadrul tezei.



De asemenea am prezentat protocolul de extragere și cultivare a celulelor mezenchimale adipoase umane pe matrici colagenice (detaliile acestui protocol mi-au fost furnizate de CS III Dr. Mădalina Albu, Șef Departament Colagen, INCDTP, București).

Aceste date constituie perspectiva unor viitoare proiecte de cercetare interdisciplinară ce vor putea implica și echipa clinicii noastre.

Direcțiile de cercetare pe care le propunem spre aplicare inițială pe modele experimentale, vizând utilizarea precursorilor adipocitari pentru imunomodulare în alotransplant, sunt redată în schema următoare:



11.7. Plasma îmbogățită cu trombocite (PRP) ca strategie imunomodulatorie

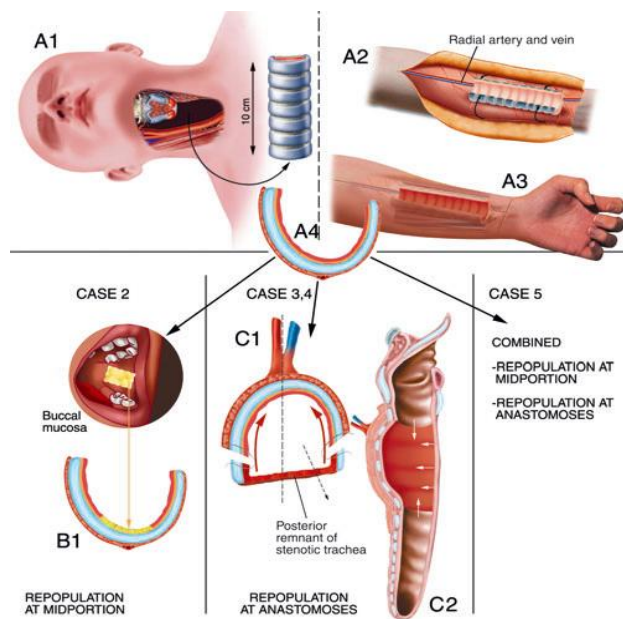
Am prezentat cazul unui pacient ars ce a beneficiat de tratament cu plasmă îmbogățită cu trombocite: la nivelul zonelor autogrefate la nivelul mâinii bilateral cât și la nivelul brațului drept, regiune ce a beneficiat de tratament, cu aspect viabil al acestora (obținerea epitelizării și vindecare completă), la momentul externării pacientului, în ziua 55 post-arsură (pacientul a fost transferat în spitalul regional pentru inițiere program de reabilitare). Restul alogrefelor, aplicate în celelalte regiuni ale corpului și netratate, au prezentat evoluție nefavorabilă cu lizarea progresivă, necesitând îndepărtarea lor și autogrefarea.

În ceea ce privește leziunile de arsură, adăugarea PRP din punct de vedere teoretic este capabilă să stimuleze angiogeneza, proliferarea vasculară, a fibroblastelor, dar și hemostaza facilitând formarea cheagului de fibrină. Studiile efectuate pe animale au relevat o reducere a infiltratului inflamator și o accelerare a procesului de vindecare pentru leziunile de arsură grad II cu reducerea celulelor pozitive pentru CD31, CD68, CD163, MPO, TGF-beta și creșterea exprimării celulare a MMP2. [65-70]

11.8. Alotransplantul de trahee: studii preliminare

Protocol chirurgical de alotransplant de trahee: studiu chirurgical la cadavru proaspăt

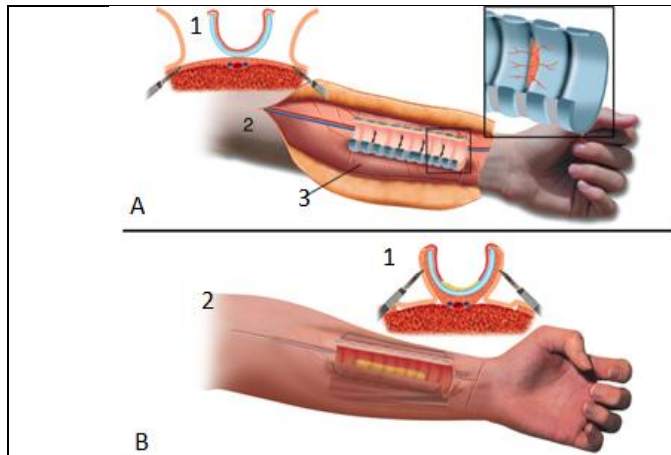
După studierea publicațiilor existente în literatura și discutării problematicii cu membrii echipei de transplant de trahee din Leuven (în cursul stagiului de mobilitate internațională efectuat în cadrul proiectului POSDRU/159/1.5/S/137390 la spitalul UZ Leuven, Belgia), am urmărit familiarizarea cu protocolul chirurgical al acestei echipe, întrucât si-a dovedit eficiența din punct de vedere al rezultatelor funcționale cât și datorită avantajului imunologic conferit de posibilitatea sistării terapiei imunosupresoare, fiind astfel evitate reacțiile adverse pe termen lung ale acesteia.



Prezentarea schematică a protocolului de transplant traheal al echipei din Leuven[71] (*Delaere PR, Vranckx JJ, Meulemans J, Vander Poorten V, Segers K, Van Raemdonck D, De Leyn P, Decaluwé H, Dooms C, Verleden G. Learning curve in tracheal allotransplantation. Am J Transplant. 2012;12(9):2538-45, Licență "John Wiley and Sons" Nr. 3942160735836*)

Am efectuat la cadavru proaspăt, de sex masculin, o reproducere parțială a primei etape a acestui protocol, de implantare heterotopică a alogrefei cartilajinoase la nivelul feței anterioare a antebrațului primitorului. Alogrefa traheală a provenit de la un alt cadavru proaspăt, dorind să reproducem situația reală întâlnită în cadrul acestui protocol.





A. Imaginea redă alogrefa traheală (1-aspect în secțiune) învelită în fascia antebrahială (2,3), observandu-se în detaliu inciziile intercatilaginoase.

B. După revascularizarea completă, la 2 luni de la implantare, epiteliul respirator al donatorului din partea centrală a alogrefei este înlăturat și înlocuit cu grefă toată grosimea prelevată de la nivelul mucoasei bucale a primitorului (vizibilă în culoare galbenă)[72]

(Delaere PR., *Tracheal transplantation, Curr Opin Pulm Med.* 2012 Jul;18(4):313-20; Licență Wolters Kluwer Health, Inc.Nr. 3942160432149)

Reproducem această primă etapă chirurgicală a protocolului Clinicii Leuven, de implantare a alogrefei traheale la nivelul feței volare a antebrațului primitorului.

În imaginile următoare am ilustrat, la cadavru, modalitatea prelevării alogrefei traheale și aspectul acesteia anterior și posterior, porțiunea posterioară, vizibilă acoperită de fascie urmând să fie poziționată în cazul unui transplant ca parte anterioară a traheei nou create.



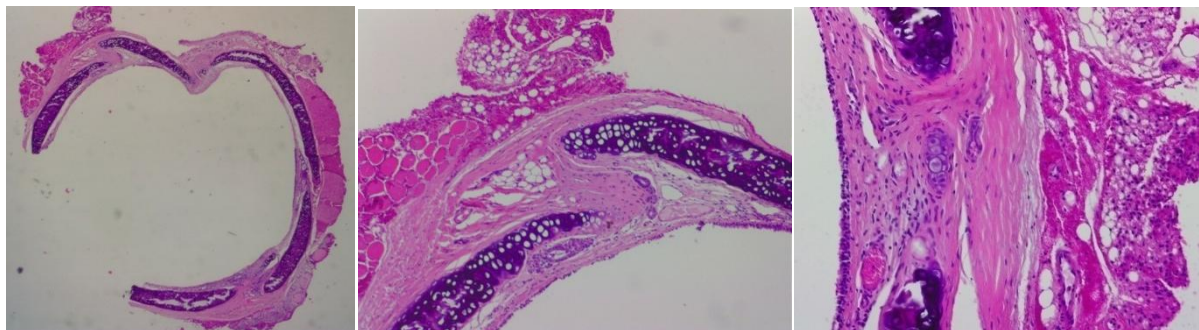
Studiu experimental preliminar în alotransplantul de trahee

În cadrul laboratorului de Microchirurgie Experimentală a SCUB am inițiat un studiu experimental, având drept model animal șobolanul, în vederea familiarizării cu tehnicile chirurgicale de alotransplant traheal, dorind să implementăm un model experimental adecvat pentru a putea ulterior evalua implicațiile imunologice ale acestui tip de alotransplant.

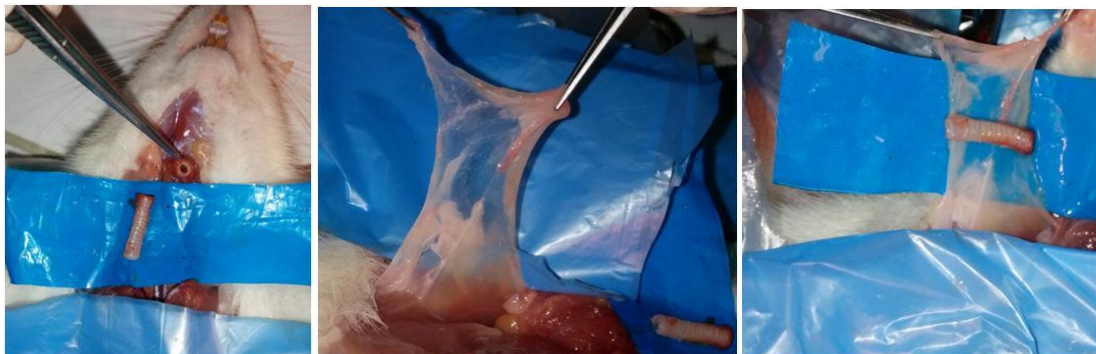


Aspectul mucoasei traheale la șobolan; se observă inelele cartilajinoase cu spațiile interstițiale ale acestora.

Am colaborat cu Dr. Valentin Enache din cadrul Departamentului de Anatomie patologică a Spitalului Clinic de Urgență București, pentru a analiza structura microscopică a traheei, într-o primă fază în situațiile normale, pentru a servi ca etalon pentru urmărirea rejecției în cadrul alotransplantului traheal:



În continuare am urmărit realizarea unui lambou prelaminat heterotopic traheal, prin implantarea alogrefei traheale la nivelul fasciei latero-toracice la șobolan (ilustrată pe model singenic):





Momentan studiile experimentale au fost preliminare urmând continuarea cercetării în vederea stabilirii unui model experimental adecvat de transplant traheal la șobolan.

Am testat de asemenea posibilitatea efectuării transplantului traheal la șoarece, fiind cunoscut avantajul utilizării șoarecilor pentru studiile imunologice.

Discuții

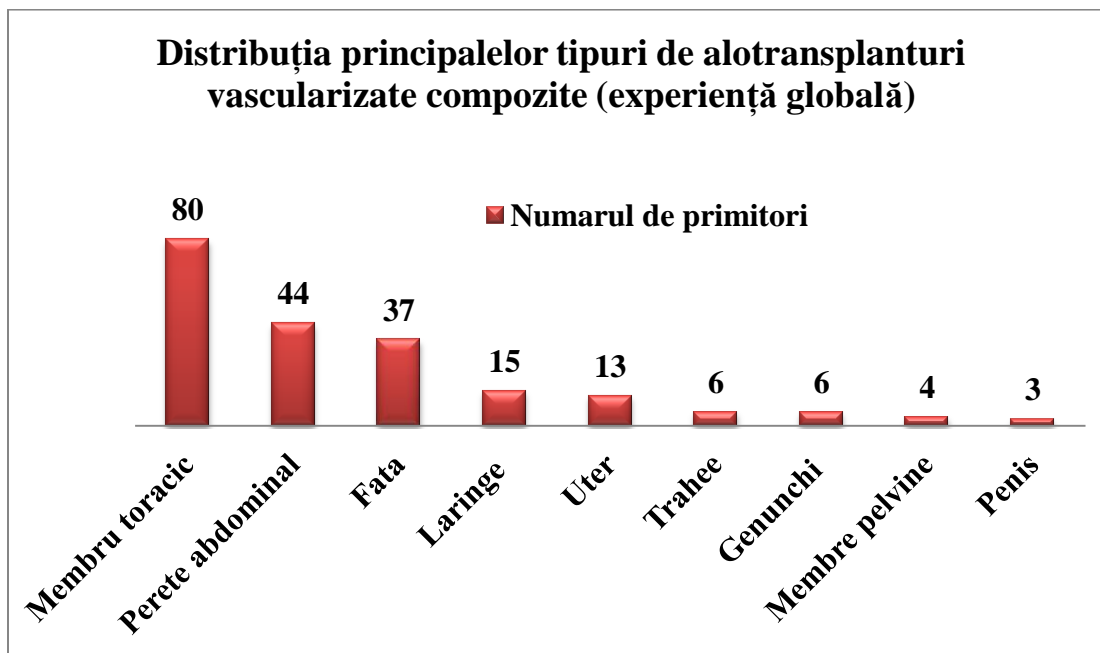
Alotransplantul traheal reprezintă o entitate promițătoare în cadrul domeniului transplantului de țesuturi compozite, dovedindu-se potențialul acestei metode terapeutice în reconstrucția căilor aeriene afectate iremediabil, îmbunătățind considerabil calitatea vieții primitorilor transplantului și de asemenea înlăturându-le comorbiditățile severe asociate absenței unei căi aeriene funcționale.

O particularitate deosebită a acestui protocol de transplant traheal este posibilitatea suprimării terapiei imunosupresoare, evitând expunerea pacientului la riscurile legate de administrarea acestei medicații pe tot parcursul vieții. În prezent alotransplantul traheal este singurul transplant vascularizat compozit în cazul căruia s-a putut întrerupe complet imunosupresia.

Acest aspect este extrem de important și încurajează promovarea alotransplantului traheal, efectuat sub o astfel de abordare tehnică, putând constitui o soluție salvatoare în cazul pacienților cu stenoze (cel mai frecvent post-traumatice) sau defecte traheale ce nu pot fi abordate prin mijloace autologe.

12. Discutii finale

Sumarizând datele expuse în capitolul **Statusul Curent al VCA**, al părții generale a tezei, prezentăm în continuare experiența cumulată la nivel internațional în domeniul alotransplantului vascularizat compozit, însumând 208 cazuri până în luna iunie a anului 2016, principalele tipuri de alogrefe compozite fiind ilustrate mai jos:



Prezentăm spre comparație câteva date din cadrul transplanturilor de organe solide:

- Conform raportării globale în activitatea de transplant de organ pentru anul 2014(cea mai recentă raportare globală disponibilă), la nivel mondial au fost efectuate în anul respectiv 119873 transplanturi de organe solide, cu o creștere procentuală cu 1.81% față de anul 2013, acoperind mai puțin de 10% din necesitățile globale(pacienți cu variate insuficiențe de organ). Distribuția pe tipul de transplant a fost la nivel mondial: rinichi 79948, ficat 26151, cord 6542, pulmonar 4689, pancreas 2328 și intestin subțire 215 transplanturi[73];
- În SUA, din ianuarie 1988 până în prezent(septembrie 2016) au fost efectuate în total 678004 transplanturi de organ, în anul 2015 fiind efectuate în total 30969 transplanturi.[74]

După cum se poate observa numărul total de alotransplanturi vascularizate compozite efectuat la nivel mondial până în prezent este extrem de mic comparativ cu experiența din transplantul de organe. Aceste date confirmă stadiul incipient al acestui domeniu. Experiența clinică din transplantul de organ a stat la baza dezvoltării programelor de alotransplant compozit, însă aspectele particulare ale acestor tipuri de procedee reconstructive sunt încă în curs de explorare pentru a stabili o conduită standardizată diagnostică și terapeutică. Tabelul următor prezintă situația actuală în alotransplantul vascularizat compozit, în ceea ce privește realizările obținute la nivel mondial și aspectele încă neclare, în curs de cercetare[2]:

Statusul curent în VCA: succese și dificultăți

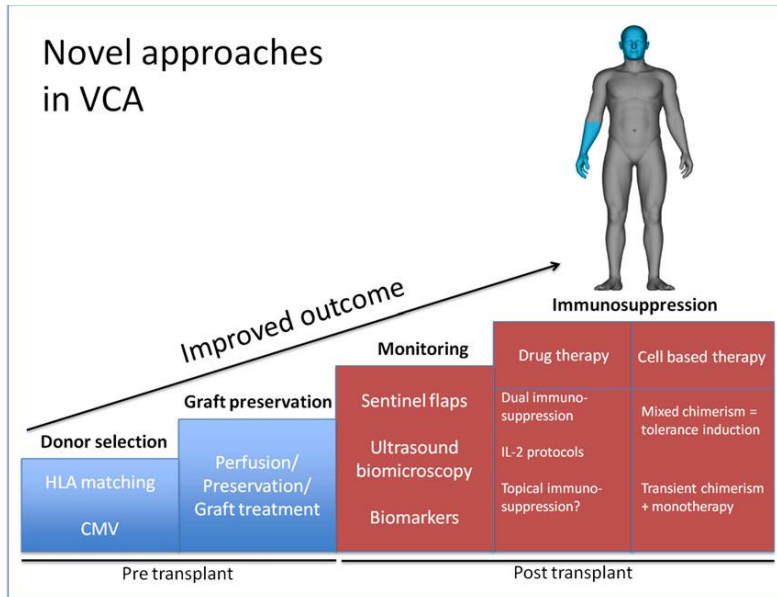
Realizari	Aspecte nesoluționate/provocări
Rezultate reconstructive funcționale și estetice foarte bune Supraviețuire foarte bună a alogrefelor și pacienților Abordare multidisciplinară Recunoașterea VCA ca organe, reglementate prin OPTN	Aspectele imunologice: <ul style="list-style-type: none">• posibilitatea minimizării imunosupresiei ;• standardizarea terapiei imunosupresoare;• protocoale/soluții pentru pacienții sensibilizați prealabil;• îmbunătățirea monitorizării alogrefelor;• înțelegerea mecanismelor rejetului;• rejecția acută prin mecanism celular;• afectarea acută a grefei prin mecanism umoral;• rejecția cronică;• strategii de inducere a toleranței imunologice Regenerarea nervoasă Definirea clară a timpilor de ischemie acceptabili Îmbunătățirea prezervării alogrefei

(Modificat după Edtinger K., Yang X., Uehara H., Tullius SG., *Current status of vascularized composite tissue allotransplantation, Burn&Trauma 2014;2:53–60.*)

Minimizarea imunogenicității alogrefei și prevenirea afectării imunologice a acesteia sunt elemente esențiale pentru îmbunătățirea prognosticului funcțional în alotransplantul vascularizat compozit și posibilității de extindere a indicațiilor acestor procedee reconstructive.

Am propus în cadrul acestei lucrări abordarea multifactorială a problemei imunologice în alotransplantul vascularizat compozit, bazându-ne și pe orientarea cercetării de ultimă oră efectuată la nivel mondial în acest domeniu.

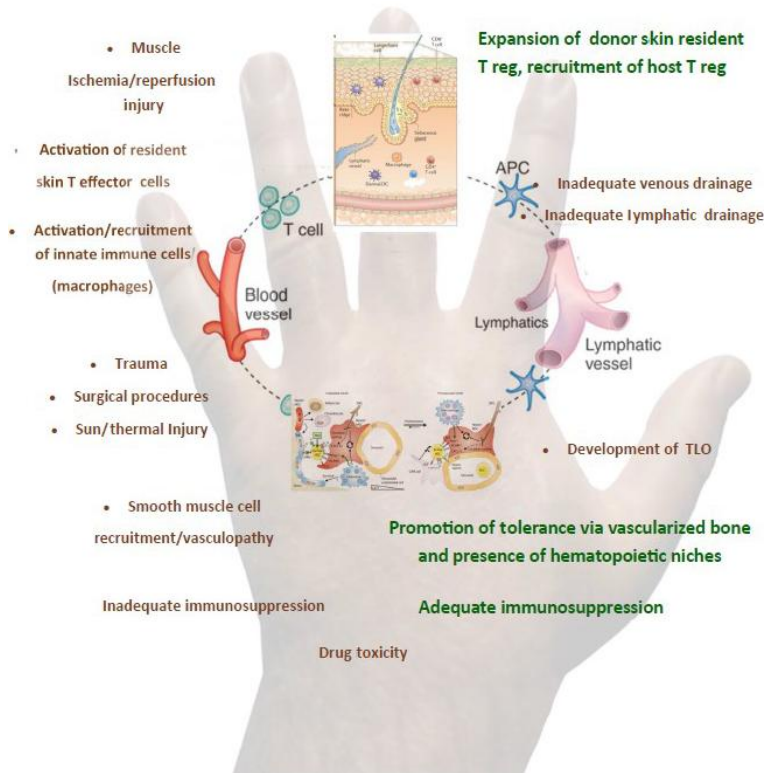
Kueckelhaus și colaboratorii propun o abordare secvențială, ce presupune parcurgerea mai multor pași, atât premergător transplantului cât și post-transplant, cu scopul îmbunătățirii rezultatelor în alotransplantul vascularizat compozit, incluzând noi arii de cercetare clinică și fundamentală. Asupra fiecărei trepte (selecția donatorilor, prezervarea grefei, monitorizarea în transplant, strategiile imunosupresoare și imunomodulatorii) se încearcă să se acționeze prin strategii terapeutice noi, cu scopul acceptării alogrefei și reducerii riscului de complicații post-transplant, după cum se poate vedea în imaginea de mai jos [75]:



(Kueckelhaus M., Fischer S., Seyda M. et al., *Vascularized composite allotransplantation: current standards and novel approaches to prevent acute rejection and chronic allograft deterioration. Transplant International, 2016; 29: 655–662., Licență John Wiley and Sons, Nr. 3944430699028*)

Kaufman și colaboratorii evaluează într-o publicație recentă aspectele complexe ale imunobiologiei alotransplanturilor vascularizate compozite, confirmând similitudinile cu alotransplantul de organe dar totodată subliniind necesitatea unei bune înțelegeri a particularităților imunologice ale acestora pentru a le putea promova utilizarea pe scară largă ca mijloace reconstructive. [76]

Factors affecting immunobiology of VCA



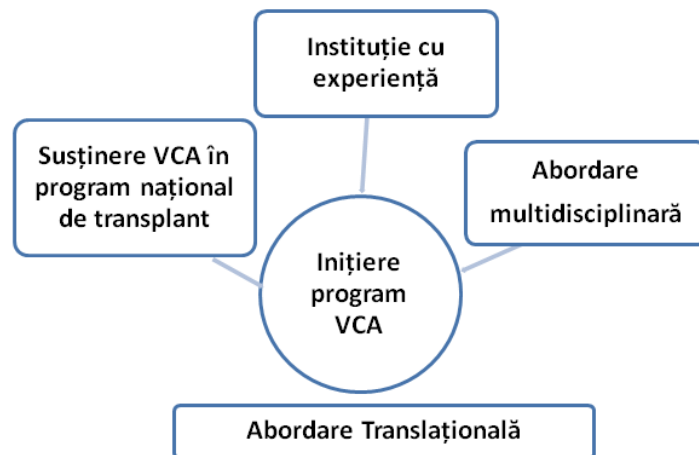
(Kaufman CL., Marvin MR., Chilton PM. et al., *Immunobiology in VCA. Transpl Int*,2016; 29: 644–654., Licență John Wiley and Sons Nr.3978171465749)

Considerăm oportună propunerea unei abordări complexe a problematicii alotransplantului vascularizat compozit, dorind ca în cursul demarării unui astfel de program în cadrul instituției noastre să urmărim fiecare detaliu ce poate influența recuperarea funcțională și aspectele imunologice, determinanții majori ai succesului unui transplant compozit.

Strategia propusă în acest sens, de urmărire detaliată a parametrilor asociați procesului de transplant, având în minte că fiecare dintre aceste elemente pot schimba statusul imunologic al pacientului, este redată schematic în continuare:

Selectie	Masuri pre-transplant	Masuri peri-transplant	Masuri post-transplant
Criterii riguroase de includere Evitarea sensibilizării prealabile Evaluare multi-disciplinara Aprobari comisii etica	Evaluare clinica Evaluari paraclinice: analize de laborator, evaluare imagistica Evaluare psihologica si psihiatrca periodica pacient+familie Evaluare imunologica: stabilire profilului imunologic al candidatului pentru transplant	Testare compatibilitate donor-primitor Pregatirea primitorului +/- desensibilizare Pregatirea atenta a interventiei chirurgicale Initiere protocoale imunologice/imunosupresoare Evitare leziuni ischemie-reperfuzie Evitare fenomene inflamatorii	Urmarire clinica si paraclinica Monitorizarea imunosupresiei Monitorizarea rejectiei: clinic+biopsii Urmarire DSA Urmarire compliantei la terapia imunosupresoare Program sustinut de recuperare functionala Protocoale de reducere a terapiei imunosupresoare si inducere a tolerantei imunologice

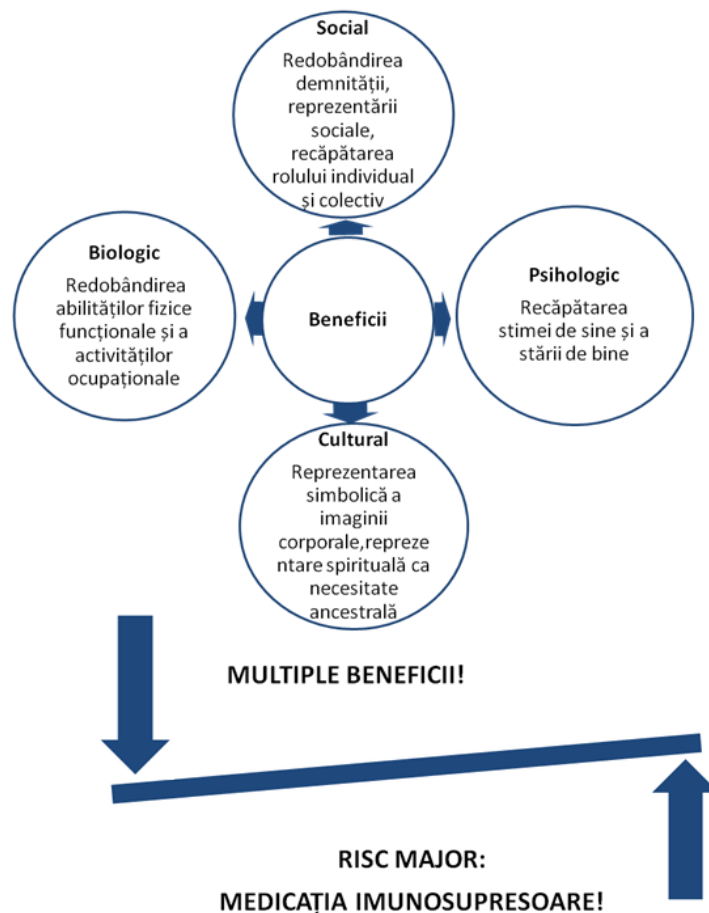
Premergător parcurgerii etapelor prezentate mai sus este necesară obținerea unui cadru legal și instituțional adecvat:



Selecția riguroasă a pacienților este o etapă esențială în alotransplantul vascularizat compozit în care scopul este reconstrucția funcțională și redobândirea calității vieții, aspect diferit de transplantul de organe unde primează aspectul vital. Se impun criteriile riguroase de includere, de la care echipa medicală nu trebuie să facă concesii. Până a se include pacientul pe lista de candidați la primirea VCA, trebuie parcurse atent evaluările comisiilor de etică, psihologice și psihiatrice. Și pe perioada de așteptare a găsirii unui donator compatibil este indicată efectuarea

de evaluări regulate a pacientului, pentru a putea surprinde orice schimbare în ceea ce privește starea de sănătate cât și stabilitatea cadrului psiho-social al acestuia.

Echipa de transplant trebuie să evalueze obiectiv balanța risc-beneficiu în cazul fiecărui pacient potențial primitor de alotransplant vascularizat compozit:



Programul de transplant tisular compozit trebuie să includă protocoale cât mai detaliate, pentru a permite standardizarea cât mai bună a procedurilor și aplicarea riguroasă a acestora, dar acest concept trebuie îmbinat cu necesitatea unei abordări individualizate în cazul fiecărui pacient.

Potențialii primitori de alotransplant compozit reprezintă un grup heterogen, chiar și în cazul aceluiași tip de alotransplant, ceea ce nu este cazul în alotransplantul de organe solide (spre exemplu la nivelul membrului superior-sedii diferite ale amputației, mecanisme diferite lezionale, calitate variabilă a țesuturilor autologe restante, anatomie variabilă, necesități de recuperare funcțională diferită post-transplant etc.).

Această variabilitate a domeniului, coroborat cu o cazuistică redusă pentru moment îngreunează procesul de elaborare a unor norme și proceduri standardizate la nivel internațional. Particularitățile tehnice și imunologice variabile ale acestor pacienți obligă echipa medicală la o adaptare continuă la nou și actualizarea în dinamică a programului de transplant, în concordanță cu rezultatele obținute în cadrul cercetării clinice și experimentale proprii cât și a recomandărilor centrelor cu experiență de la nivel internațional.

Rezultate favorabile în alotransplantul vascularizat compozit au fost obținute în centrele ce au dovedit o preocupare pe termen lung asupra domeniului, acumulând în cadrul unor programe de cercetare translațională, experiența necesară atât în ceea ce privește detaliile tehnice cât și aspectele imunologice. Exemple în acest sens sunt demonstrate în transplantul de mână și față, cât și în cazul transplanturilor mai puțin comune cum sunt cele de uter (echipa din Suedia desfășurând o intensă activitate de cercetare pretransplant) și trahee (program de cercetare translațională a echipei din Leuven, Belgia).

Lipsa aderenței terapeutice la medicația imunosupresoare, cauzată de necomplianța pacientului sau de inaccesibilitatea la terapie (condiții economice precare, lipsa educației, program de transplant incorect implementat, ce nu asigură corespunzător urmărirea pe termen lung a pacienților) pare a fi un numitor comun într-o mare proporție a cazurilor eșuate, ce au dus la rejeț și pierderea alogrefelor VCA. Aceasta subliniază încă o dată importanța selecției riguroase a pacienților, monitorizarea și susținerea terapeutică pe termen lung a acestora.

Urmărirea atentă a statusului imunologic al pacienților este esențială. Se urmărește compatibilitatea de grup sangvin și se dorește de asemenea o cât mai bună compatibilitate imunologică donor-primitor, însă aceasta din urmă poate fi dificil de obținut în absența unui număr suficient de mare de donatori disponibili pentru un anumit pacient. În procesul de selecție a pacienților trebuie respectați toți parametrii indicați, atât imunologici cât și non-imunologici (criterii generale) pentru a se asigura un rezultat cât mai bun pe termen lung.

Din acest motiv și în cadrul experienței personale, am acordat o atenție deosebită elaborării protocolului de selecție a pacienților candidați pentru VCA (prezentat în cadrul tezei). De asemenea am urmărit în cadrul cazuisticii clinicii pacienții ce au prezentat defecte tisulare complexe, pentru familiarizarea cu algoritmi de decizie terapeutică ce includ în paleta reconstructivă atât procedeele autologe cât și potențiala utilizare a alotransplantului vascularizat compozit. Considerăm importantă aderența clinicianului la aceste noi paradigme reconstructive pentru a alege corect indicația efectuării unei reconstrucții utilizând alotransplantul vascularizat compozit, în condiții de siguranță pentru pacient și cu așteptarea celor mai bune rezultate funcționale.

Dintre toate mecanismele lezionale ce duc la defecte tisulare extensive, mutilante, pretabile la reconstrucția utilizând alotransplantul vascularizat compozit, cele mai mari controverse sunt asociate arsurilor. Din acest motiv am efectuat un studiu clinic asupra pacienților arși spitalizați în cadrul unității noastre, în cursul căruia am analizat considerentele clinice și imunologice asociate potențialei utilizări VCA ca soluție reconstructivă la aceasta categorie de pacienți. Leziunile mutilante sunt cel mai frecvent asociate electrocuțiilor cu voltaj înalt, însă și în cazul arsurilor termice profunde cervico-faciale sau la nivelul membrelor pot duce la diformități și sechele greu abordabile prin metodele reconstructive autologe. Leziunile postcombustionale determină provocări reconstructive atât din punct de vedere tehnic, cât și imunologic. Modificările arhitecturii tisulare, cicatricile vicioase, fibroza și afectarea vascularizației obligă la investigații imagistice atent efectuate pre-operator și o planificare atentă a intervenției chirurgicale de alotransplant, ce se poate complica atât din pricina disecției dificile și calității incerte a pediculilor vasculari, cât și prin posibilele afecțiuni sistemice ale pacienților arși (frecvent aceștia prezintă comorbidități severe, rezultate în urma răsunetului sistemic major al unei arsuri severe).

Un risc imunologic major îl constituie sensibilizarea pacienților pre-transplant, din cauze variate (sarcina, transfuzii multiple, transplant anterior, utilizarea homogrefelor, utilizarea dispozitivelor de asistare). În rândul pacienților cu arsuri severe, extensive, necesitând terapie intensivă de lungă durată, transfuzii sangvine și acoperirea temporară a defectelor post-combustionale cu homogrefe, sunt șanse foarte mari de dezvoltare a anticorpilor anti-HLA, rezultând chiar scoruri PRA cu valori înalte.

Deși sunt propuse diferite strategii de desensibilizare, în cazul VCA considerăm prudent a nu se include pe lista primitorilor a pacienților presensibilizați, dovedite fiind riscurile imunologice asociate prezenței anticorpilor anti-HLA ai donatorului (DSA), implicați în rejet umoral, frecvent greu controlabil terapeutic.

În cadrul programului VCA testările imunologice efectuate cu regularitate (conform protocolului propus) sunt obligatorii în procesul de selecție, cât și pentru supravegherea statusului imunologic și posibilitatea sancționării terapeutice prompte a unui episod de rejet.

De asemenea respectarea protocolului de testare infecțioasă este un element cheie în cazul pacienților beneficiari de transplant compozit. Complicațiile infecțioase deteriorează starea generală a pacienților, mergând până la riscul de dezvoltare a sepsisului sau a unor malignități, situații ce pot conduce la decesul pacientului. Nu trebuie neglijată corelația între infecții și consecințele imunologice generate de acestea. Fenomenele inflamatorii intense cât și o serie de infecții cum sunt cele virale (herpetice, CMV), au fost asociate cu declanșarea episoadelor de rejecție acută. [37, 77]

Intervenția chirurgicală propriu-zisă este un alt determinant major al rezultatelor pe termen lung în alotransplantul vascularizat compozit. Se impune planificarea preoperatorie atentă a intervențiilor chirurgicale de prelevare a alogrefei de la donator și transplant la primitor. Investigațiile imagistice sunt foarte utile în aprecierea arhitecturii tridimensionale a zonei receptoare. Am analizat în acest sens utilitatea angio-CT în cadrul planificării preoperatorii în vederea alotransplanturilor vascularizate compozite, investigația dovedindu-se foarte eficientă în aprecierea detaliată a vascularizației regiunii studiate (în cazul nostru abdomenul inferior), în prezența unor programe informatice moderne ce permit procesarea imaginilor achiziționate la o calitate foarte bună. Se studiază în acest sens și alte metode diagnostice precum angio-RMN sau ultrasonografia. Deși are avantajul că nu iradiem pacientul, angio-RMN nu este la fel de eficientă în investigarea vaselor de calibr mic.

Toate aceste eforturi privind pregătirea riguroasă pre-operatorie se justifică pentru optimizarea timpilor operatori (cunoscut fiind faptul că alotransplanturile vascularizate compozite sunt proceduri extrem de laborioase, cu durată îndelungată datorită tehnicilor reconstructive complexe macro- și micro-chirurgicale). Cel mai important aspect este prevenirea leziunii de ischemie-reperfuție, cunoscută ca factor de activare a răspunsului imun înăscut. Leziunea de ischemie-reperfuție determină un status pro-inflamator local la nivelul alogrefei ce persistă timp îndelungat, ducând la instalarea rejecției și imposibilitatea implementării de strategii de inducere a toleranței imune, rezultatul fiind deteriorarea funcțională a alogrefei. Strategii terapeutice noi ce țintesc moleculele de adeziune, receptorii pentru complement și receptorii Toll-like par a fi promițătoare în reducerea efectelor negative exercitate asupra alogrefelor în urma leziunii de ischemie reperfuție, însă aceste date sunt încă în faza de testare.

O abordare corectă este cea a prevenției apariției leziunii de ischemie reperfuzie prin punerea la punct a fiecărui detaliu din cadrul intervenției chirurgicale și de asemenea prin îmbunătățirea perfuziei și prezervării alogrefei.

Tehnicile de prezervare a alogrefei s-au dovedit foarte importante pentru succesul terapeutic al alotransplanturilor de organe. Perfuzia hipotermică pulsatilă a alogrefei(HMP-Hypothermic machine perfusion) s-a dovedit mai eficientă decât stocarea statică la rece în ceea ce privește reducerea riscului de întârziere a în funcționare a alogrefelor renale.[78] Astfel de strategii ar putea fi aplicate pe viitor și în cazul alotransplanturilor vascularizate compozite. Îmbunătățirea rezultatelor chirurgicale s-ar putea obține și prin utilizarea unor noi tehnologii cum este de exemplu printarea tridimensională (3D printing). Printarea 3D a fost testată pentru planificarea preoperatorie a transplantului hepatic de către Zein și colaboratorii, dovedindu-se promițătoare pentru pacienții ce prezintă modificări anatomice, scăzând riscul de complicații operatorii.[79] În domeniul VCA printarea 3D a fost utilizată în planificarea intervenției chirurgicale în cazul primului alotransplant bilateral de mână la copil, efectuat în SUA de către echipa condusă de Dr. Scott Levin.[80]

Un aspect esențial în ceea ce privește influențarea succesului VCA este modul în care se efectuează monitorizarea apariției rejecției și intervenția terapeutică promptă în cazul decelării acesteia.

Pasul cheie pentru a obține acest obiectiv, este de a înțelege imunogenicitatea relativă a diferitelor componente ale VCA și de a ajusta tratamentul în mod corespunzător. Astfel, vom descrie și conceptualiza răspunsul imun față de diferite țesuturi cu atenție deosebită față de forțele de rejecție în cazul VCA. Componentele unei VCA vascularizate demonstrează un rol bine stabilit cu privire la severitatea răspunsului imun indus, cantitatea de imunosupresie necesară pentru supraviețuirea alogrefei, impactul și consecințele rejecției. În acest context, transplantul alogrefelor compozite reprezintă o situație mult diferită și plină de provocări față de transplantul de organe solide, dar aceasta reprezintă și o oportunitate de a ținti fiecare componentă individual. De asemenea rămâne încă de elucidat răspunsul imun intrinsec rezultat din asocierea mai multor tipuri tisulare diferite în cadrul VCA.

Incidența mare a rejetului acut în VCA se datorează imunogenității acesteia, iar diagnosticul facil al acesteia este posibil prin monitorizarea vizuală a alogrefei, situație diferită de cea din transplantul de organe.

Și în ceea ce privește evaluarea histopatologică în alotransplantul vascularizat compozit există o serie de aspecte ce nu au fost încă clarificate. O întrebare care se pune este cum se poate face corect monitorizarea rejecției și care este țesutul optim ce poate evalua rejecția(globală) a alogrefei? Aceasta este o problemă importantă, întrucât deciziile referitoare la ajustarea/creșterea dozelor terapeutice imunosupresoare se bazează pe rezultatele examenelor histopatologice ale probelor bioptice, cunoscut fiind faptul că examenul microscopic al țesuturilor pare să fie în prezent cel mai eficient indicator al rejecției în VCA. Pielea este considerată cel mai antigenic țesut în cadrul componentelor VCA; în cazul transplantului facial s-a constatat o rejecție chiar mai accentuată decât în cazul tegumentului, la nivelul mucoasei bucale(permițând prelevarea de biopsii mucoase, biopsiile tegumentare repetate de la nivelul alogrefei faciale fiind greu acceptate de către pacient).[81] Biopsiile repetate la nivelul alogrefei sunt un factor agresiv local: după cum am amintit traumele repetate la nivelul alogrefei, incluzând stresul mecanic dar și

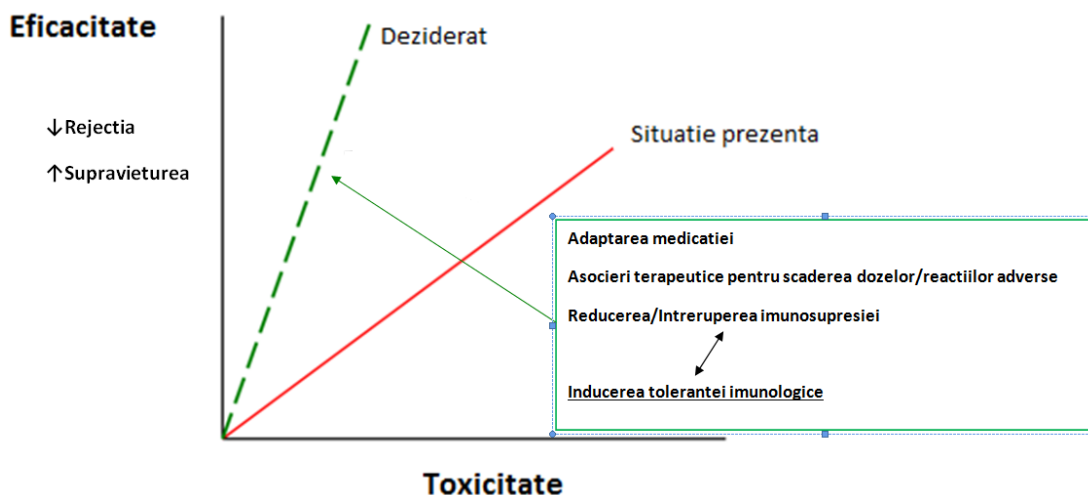
intervenții chirurgicale seriate pot menține un status inflamator declanșator al rejetului, ce duce la deteriorarea funcționalității grefei. Utilizarea grefelor santinelă este considerată o soluție, însă mai trebuie cercetată corelația clară a intensității rejetului la nivelul acesteia și la nivelul alogrefei VCA. Alotransplantul vascularizat al unui lambou santinelă pare să reprezinte o soluție ce asigură monitorizarea mai eficientă a alogrefei.

O abordare recentă este cea a utilizării unor tehnici non-invazive de monitorizare a rejecției, cum ar fi biomicroscopia cu ultrasunete, investigată în cadrul alotransplanturilor de față și membru superior. O altă direcție de monitorizare non-invazivă a alogrefelor este de identificare a biomarkerilor asociați rejecției. [75]

În urmărirea pe termen lung a pacienților beneficiari ai VCA trebuie să avem în vedere toate mecanismele ce pot fi implicate în rejecție, și toate fațetele fenomenului de rejet: atât rejecția acută mediată celular, cea mai comună în VCA, cât și formele atipice de rejet, rejetul mediat umoral prin anticorpi DSA sau non-HLA, cât și riscul apariției rejetului cronic.

Evitarea apariției rejecției se obține prin administrarea terapiei imunosupresoare sau în situația inducerii toleranței imunologice. În prezent nu a fost obținută toleranță în practica clinică VCA.

Protocoalele imunosupresoare existente în transplanturile de organe, s-au dovedit eficiente și în cazul alotransplantului vascularizat compozit. Dorința comunității medicale este minimizarea terapiei imunosupresoare, pentru a evita efectele adverse ale acesteia:



Complicațiile în VCA, sub terapie imunosupresoare pe termen scurt (în principal infecții oportuniste și complicații metabolice) post-transplant au fost similare în transplantul de mână și cel facial, însă pe termen lung s-a observat o incidență mai mare a complicațiilor apărute pe termen lung după transplantul de față (incluzând infecții oportuniste, complicații metabolice și malignități). [82]

Cercetarea actuală în VCA și-a concentrat eforturile în vederea elaborării unor strategii de inducere a toleranței imunologice.

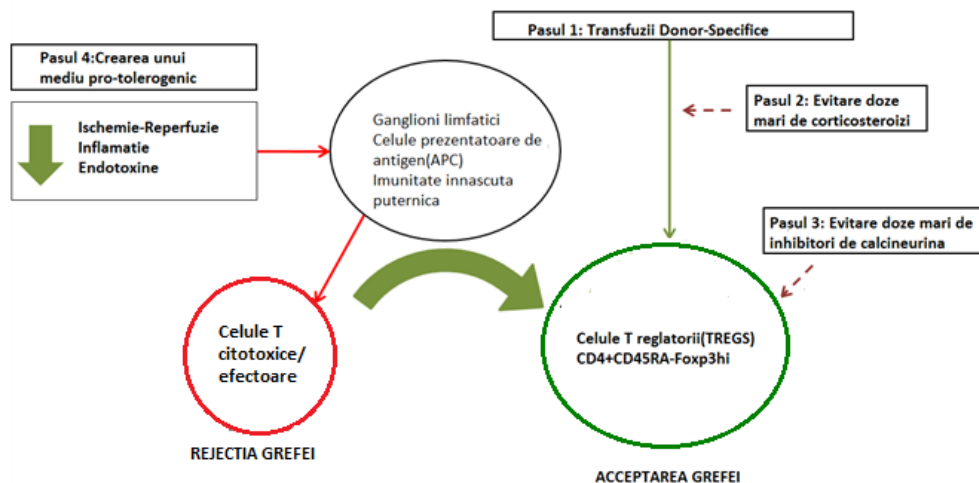
Am explorat în cadrul activității experimentale efectuate, implicarea măduvei osoase vascularizate în inducerea toleranței imune în alotransplantul vascularizat compozit cât și

utilizarea acesteia ca potențială alternativă la transplantul medular convențional. După cum am prezentat anterior, în transplantul renal strategiile protolerogenice bazate pe inducerea chimerismului hematopoietic au fost singurele ce s-au dovedit eficiente, cu posibilitatea opririi administrării terapiei imunosupresoare, astfel ca aceste strategii se justifică explorate și în cazul VCA. Transplantul de măduvă osoasă vascularizată (VBMT) este o îmbinare de paradigme, o greafă solidă de organ care poate funcționa asemeni unei grefe de măduvă osoasă și conține suplimentar celule stromale cu potențial pluriotent și imunomodulator neexploatat. Deși datele actuale cu privire la VBMT sunt încă preliminare, aplicațiile în domenii precum transplantul medular convențional, transplantul de organe solide și VCA justifică investigații ulterioare. În transplantul medular convențional, protocoalele preoperatorii obligatorii de condiționare sunt țintite către anumite componente ale măduvei osoase, printre acestea se numără elementele limfohematopoietice, celulele stromale, ambele suferind daune iremediabile. Utilizarea VBMT aduce următoarele avantaje: debutul imediat al reconstituției hematopoietice fără a mai fi nevoie de perioada de grefare; propria sursă de celule stromale pentru a asigura reînnoirea celulară; asigurarea unui mediu imunomodulator pentru inducerea toleranței. Transplantul de organe fără imunosupresie pe termen lung este scopul acestor strategii terapeutice. Potențialul imunomodulator al VBMT a fost sugerat de studii ce au investigat diferite componente ale CTA. Cotransplantul de organ-VBMT reprezintă un pas important de urmat în viitor.

VBMT este o ramură a VCA și pare a avea potențialul de a influența major rezultatele în alotransplantul compozit. Acesta fiind contextul internațional al cercetării VBMT, am încercat, prin intermediul activității experimentale efectuate (o parte ca cercetări preliminare) să punem bazele unui program mai amplu de cercetare, ce ar putea permite translatarea informațiilor obținute către practica clinică. De asemenea, în cadrul studiului anatomo-chirurgical efectuat la cadavru am probat fezabilitatea ridicării lamboului vascularizat de creastă iliacă pentru o potențială utilizare ca alogrefă.

Direcțiile viitoare de studiu promovează utilizarea strategiilor de inducere a toleranței imune bazate pe terapii celulare incluzând chimerismul hematopoietic, celulele T reglatorii, celulele stem mezenchimale. O direcție ce s-a dovedit utilă este promovarea unui mediu protolerogenic și asocierea mai multor strategii consacrate în inducerea toleranței imune. Un astfel de protocol de inducere a toleranței imunologice, util de abordat și în alte subdomenii ale transplantului, este cel al echipei din Leuven, dezvoltat pentru transplantul intestinal. Transplantul de intestin prezintă multiple provocări de ordin imunologic, aceste proceduri fiind asociate cu o incidență mare a rejecției și complicații asociate imunosupresiei. A fost dezvoltat un protocol imunomodulator ce asociază manevre ce si-au dovedit experimental eficiența în promovarea mecanismelor protectoare ale alogrefei, dependente de celulele T reglatorii (TREGS). Protocolul include transfuzii sangvine donor specifice, evitarea dozelor mari de steroizi și inhibitori de calcineurina, minimizarea leziunii de reperfuzie și a translocației endotoxinelor. Protocolul a fost aplicat, între anii 2000-2014, în cazul a 13 alotransplanturi intestinale de la donatori decedați, cu o supraviețuire a alogrefei/pacienților la 5 ani de 92%. [83]

PROTOCOLUL IMUNOMODULATOR LEUVEN(LIP)
-pentru transplantul de intestin-



(Ceulemans LJ, Braza F, Monbaliu D, et al. The Leuven Immunomodulatory Protocol Promotes T-Regulatory Cells and Substantially Prolongs Survival After First Intestinal Transplantation. *Am J Transplant* 2016. doi: 10.1111/ajt.13815, Licență John Wiley and Sons, Nr.: 3943211256837)

Am urmarit de asemenea în cursul programului doctoral, în cadrul unor studii preliminare, posibilitatea abordării în practica clinică a unor strategii protolerogenice bazate pe celulele mezenchimale din țesutul adipos și pe utilizarea locală a plasmei îmbogățite cu trombocite (PRP), cu rezultate promițătoare și pentru VCA. Studii ulterioare sunt necesare pentru completarea datelor și validarea acestor ipoteze.

Tot ca cercetări preliminare am studiat protocolul operator utilizat de echipa spitalului UZ Leuven, Belgia în alotransplantul traheal în cadrul unui studiu chirurgical efectuat la cadavru proaspăt. Am demarat și un studiu experimental, încă în fază incipientă, cu scopul elaborării unui protocol de alotransplant traheal la șobolan, pentru testarea ulterioară a unor protocoale de inducere a toleranței imunologice. Interesul pentru alotransplantul de trahee în contextul acestei lucrări de doctorat cu orientare imunologică, este datorat situației unice în cadrul VCA, de posibilitate a sistării complete a terapiei imunosupresoare la beneficiarii acestui tip de alotransplant, promovând șansa utilizării acestei metode reconstructive la cazurile selecționate. Deși prezintă particularități anatomice și tehnice față de restul tipurilor de alotransplant compozit, este posibil ca unele date din cadrul programului de alotransplant traheal să poată fi extrapolate și către alte tipuri de alotransplant, cu îmbunătățirea rezultatelor privind acceptarea alogrefelor.

Un alt tip de alotransplant compozit ce ne-a atras atenția a fost transplantul de perete abdominal, fapt dovedit și de orientarea unei părți reprezentative a cercetării către această regiune anatomică: studiul imagistic efectuat în Leuven în cadrul mobilității internaționale susținută prin proiectul POSDRU/159/1.5/S/137390 a evaluat vascularizația peretelui abdominal inferior, am efectuat un studiu anatomo-chirurgical la cadavru proaspăt pentru familiarizarea cu protocolul operator de prelevare a alogrefei de perete abdominal, cât și evaluarea unui model experimental de ridicare a lamboului pe toată grosimea de hemiperete abdominal la șobolan. Transplantul de perete abdominal și-a dovedit eficiența în închiderea cavității abdominale după alotransplanturile

multiorgan, oferind o perspectivă reconstructivă unică acestor pacienți, fără de care se pune problema riscului vital în cazurile respective. Transplantul de perete abdominal este o entitate aparte în cadrul VCA, fiind efectuat ca metodă adjuvantă în alotransplantul de organe la pacienți ce primesc terapie imunosupresoare pentru transplantul de organ, astfel încât este un alotransplant compozit ce nu se supune controverselor etice asociate altor tipuri de alotransplanturi compozite. Componenta tegumentară a alogrefei de perete abdominal servește și la monitorizarea rejecției organelor transplantate.

În contextul în care se va dezvolta și la nivel național un program mai amplu de transplant multiorgan, considerăm utilă preocuparea noastră, ca și chirurghi plasticieni pentru deprinderea protocolului chirurgical de transplant de perete abdominal, ce va putea fi efectuat concomitent cu transplanturile de organe la pacienții la care nu se poate obține închiderea peretelui abdominal prin metode autologe. De asemenea este foarte important de studiat, în cadrul modelelor experimentale, comportamentul imunologic al acestui tip de alogrefă, de mari dimensiuni și cu componentă structurală complexă, ce poate influența dinamica răspunsului imun. Pe viitor, dacă protocolele de inducere a toleranței imunologice se vor dovedi eficiente, alotransplantul de perete abdominal ar putea fi luat în considerare și ca procedeu chirurgical izolat la pacienții cu defecte complexe, cu expunerea organelor intraabdominale.

Este încurajată cercetarea cu scopul dezvoltării unor strategii protolerogenice în toate subdomeniile medicinei de transplant, alotransplantul vascularizat compozit fiind un exemplu în acest sens, cu atât mai mult cu cât nu constituie o indicație salvatoare de viață.

Translația către practica clinică în domeniul imunomodulării este anevoioasă, și de asemenea în cazul fazei clinice trebuie să se urmeze o serie de pași pentru urmărirea corectă a implementării strategiilor protolerogenice.

Elementele ce trebuiesc monitorizate în cadrul strategiilor clinice de inducere a toleranței imunologice sunt[35]:

- evaluarea reactivității imune:
 - în sânge:
 - evaluarea aloreactivității directe și indirecte a limfocitelor T prin: proliferare, analiza citokinelor, diviziune celulară, hipersensibilitate întârziată trans-vivo;
 - determinarea profilurilor de expresie utilizând markerii de activare limfocitară;
 - evaluarea răspunsului imun umoral;
 - la nivelul alogrefei:
 - evaluare morfologică și imunohistochimică a alogrefei;
 - profilul de expresie a markerilor de activare limfocitară la nivelul grefei;
- polimorfism genetic imunologic;
- analize de tip micro-array și proteomice definind gene și proteine asociate toleranței imunologice.

Direcții potențiale pentru promovarea imunomodulării

Am urmărit identificarea unor direcții noi de studiu ce pot constitui puncte de plecare în cercetările viitoare din domeniul inducerii toleranței imunologice în transplant, având în minte

posibilitatea utilizării acestora, individual sau în cazul unor strategii complexe imunomodulatorii, și în cadrul alotransplantului vascularizat compozit:

-utilizarea Data Mining alături de tehnologiile noi de analiză moleculară și genomică pentru a încerca să se determine biomarkerii asociați statusului protolerogenic.

-utilizarea unor terapii celulare imunomodulatorii noi, precum celulele imunomodulatorii de la nivelul cordonului ombilical și celulele tecale olfactive(Olfactory ensheathing cells:OECs).

Concluzii

Transplantul alogrefelor vascularizate compozite este un domeniu de înalta complexitate, ce a devenit recent o realitate clinică, în urma progreselor realizate cumulativ în medicina de transplant, imunologie, tehnicilor reconstructive microchirurgicale și farmacologiei.

Începând cu anul 1998, când a fost efectuat primul transplant de mână, alotransplantul tisular compozit s-a transformat dintr-un domeniu experimental într-o opțiune reconstructivă importantă, unică de altfel, pentru pacienții cu defecte tisulare complexe, imposibil de abordat prin tehnicile chirurgicale convenționale.

Până în prezent la nivel mondial, au fost realizate peste 200 astfel de proceduri, experiența clinică fiind dominată de alotransplantul de membru superior(uni-/bilateral), însumând 80 de cazuri, transplantul facial(37 cazuri) și 44 cazuri de transplant de perete abdominal(acesta din urmă reprezentând o situație distinctă în cazul VCA, fiind efectuat până în prezent doar în asociere cu transplanturi multiorgan sau transplantul unui singur organ). Interesul comunității internaționale se îndreaptă și către alte tipuri de transplanturi, cum ar fi cele de uter și penis, entități clinice încă controversate etic, cu mare impact mediatic și psiho-social, însă studiate pentru potențialul lor în refacerea calității vieții pacienților. Cu alotransplanturile de membre pelvine cât și cele de articulație a genunchiului s-au înregistrat multiple complicații, ducând în majoritatea cazurilor la eșecul acestor proceduri, astfel încât indicația lor rămâne rezervată, cu atât mai mult cu cât se cunoaște eficiența mijloacelor moderne de protezare externă a membrului pelvin, în menținerea calității vieții pacientului. Transplanturile de laringe și trahee au de asemenea un rol important în reconstrucția funcțională în cazurile atent selecționate, controversate existând în ceea ce privește includerea pe lista primitorilor unor astfel de alogrefe a pacienților cu patologie tumorală. Intervențiile majore, incluzând transplanturi simultane de membre toracice și pelvine, sau membre toracice-transplant facial s-au dovedit un eșec până în prezent, fiind indicată abordarea rezervată a lor pentru moment.

Nefiind până în prezent o cazuistică impresionantă ca în cazul transplantului de organe și neavând criterii comune reglementate la nivel internațional, este dificil de evaluat cu acuratețe statusul real al domeniului transplantului tisular compozit, din punct de vedere al tuturor parametrilor implicați. Acest aspect face dificilă desprinderea unor concluzii clare legate de fiecare etapă implicată în transplant și poate îngreuna optimizarea protocoalelor terapeutice. Deși există Registrul Internațional de Transplant de Mână și Țesuturi Compozite momentan raportarea în cadrul acestuia este voluntară, neavând actualizate datele de la toate echipele de alotransplant vascularizat compozit.

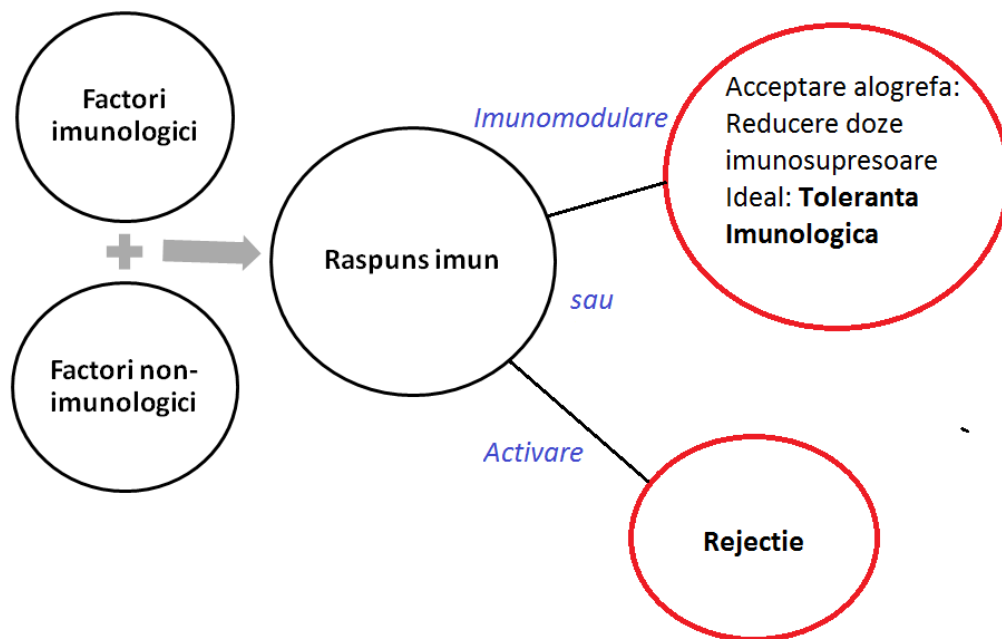
Un moment important în transplantul alogrefelor vascularizate compozite, a fost recunoașterea, în SUA, de către UNOS, ca domeniu distinct în medicina de transplant, începând cu 3 iulie 2014, definirea clară a acestei noi entități terapeutice și posibilitatea aplicării reglementărilor standardizate existente în transplantul de organe. Dezvoltarea pe viitor a colaborărilor multi-instituționale, internaționale este de mare importanță, permițând extinderea indicațiilor alogrefelor vascularizate compozite ca procedee reconstructive cât și îmbunătățirea rezultatelor clinice ale acestora.

Provocările majore ale domeniului alotransplantului vascularizat compozit sunt reprezentate de aspectele imunologice, comunitatea internațională fiind în căutarea unor strategii ce ar permite

minimizarea terapiei imunosupresoare și ideal inducerea toleranței imunologice, situație greu de obținut în practica clinică. Alogrefele vascularizate compozite fiind structuri heterogene histologic, cu antigenicitate diferită a fiecărei componente, determină un răspuns imun complex, rezultat din interacțiunea acestor componente. Antigenicitatea relativă a diferitelor componente ale VCA reprezintă o barieră majoră pentru aplicațiile VCA la un număr mare de pacienți, dar totodată constituie un element cheie în realizarea unor protocoale imunosupresoare și imunomodulatoare adecvate în acest domeniu. Reducerea imunogenității alogrefei și prevenirea deteriorării acesteia în cadrul fenomenelor de rejecție reprezintă elemente critice în determinarea succesului unui alotransplant vascularizat compozit, permițând recuperarea funcțională și menținerea adecvată a calității vieții pacientului.

Este obligatorie o cunoaștere în detaliu a mecanismelor moleculare implicate în imunologia transplantului alogrefelor vascularizate compozite.

Considerăm utilă analiza tuturor factorilor ce influențează răspunsul imun în VCA, deoarece orice detaliu poate să influențeze rezultatul final în transplant, în funcție de modul de acțiune asupra sistemului imun al gazdei, acesta putând să vireze către o stare imunomodulatorie, cu acceptarea(ce puțin parțială) a alogrefei, sau se poate activa rezultând rejecția alogrefei:



Nu este suficientă elaborarea unor strategii specifice de inducere a toleranței imunologice dacă nu promovăm un status protolerogenic la nivelul gazdei: se urmărește crearea unui "mediu" favorabil imunomodularii, evitând fenomenele inflamatorii și situațiile ce pot stimula declanșarea episoadelor de rejecție.

Pasul inițial constă în elaborarea unui program de transplant vascularizat compozit, corect reglementat, pe modelul actual al platformelor de cercetare translațională, coroborat cu un cadru etic și legal favorabil.

La nivel instituțional, colaborarea în echipe multidisciplinare asigură managementul terapeutic corect al unui pacient cu necesități complexe cum este un candidat la un procedeu reconstructiv utilizând alotransplantul vascularizat compozit.

Vor fi selectați candidații ce pe lângă indicația medicală de reconstrucție cu alogrefa compozită, prezintă un profil psihologic și social adecvat: să aibă motivație puternică pentru efectuarea transplantului, au demonstrat o complianță ridicată în ceea ce privește îngrijirea medicală în trecut, au un sprijin bun din partea familiei, sunt flexibili și capabili să aibă o gândire centrată pe rezolvarea problemei, pentru a se adapta pierderii temporare a funcționalității și să accepte reabilitarea după transplant. Prezența unor așteptări realiste în ceea ce privește riscurile imunosupresoare, complicațiile chirurgicale și înțelegerea obiectivă a beneficiilor funcționale după transplant reprezintă cel mai bun scenariu pentru un candidat pregătit din punct de vedere psihologic. Toate aceste cerințe trebuie îndeplinite deoarece s-a dovedit incriminarea non-complianței terapeutice ca factor major în riscul de dezvoltare a episoadelor succesive de rejecție acută, ce duc în final la rejet cronic cu deteriorarea ireversibilă a alogrefei și necesitatea înlăturării acesteia.

În rândul pacienților ce pot necesita reconstrucții utilizând VCA, o categorie aparte este reprezentată de pacienții arși, datorită particularităților clinice și imunologice ale acestora, impunând prudență deosebită în momentul includerii lor pe lista potențialilor primitori ai unei alogrefe compozite, având în minte necesitatea monitorizării regulate a acestora pentru a detecta prezența anticorpilor preformați și de asemenea impunându-se o conduită chirurgicală mai laborioasă.

Testările imunologice efectuate într-un laborator acreditat cât și cele pentru complicațiile infecțioase sunt obligatorii și se efectuează cu regularitate, conform schemei stabilite în programul de transplant compozit.

Planificarea atentă a intervenției chirurgicale, efectuarea acesteia în cele mai bune condiții tehnice (cu principii de lucru cât mai atraumatice, manipulare blândă a țesuturilor, control atent al hemostazei, limitând orice răspuns inflamator inutil) și limitarea riscului de apariție a leziunilor de ischemie-reperfuzie sunt de asemenea elemente importante.

În urma studiilor efectuate, am avut confirmarea că investigația angio-CT reprezintă un mijloc eficient în evaluarea precisă a teritoriilor vasculare și a relațiilor anatomice existente între structurile tisulare, permițând o planificare operatorie riguroasă, oferind detalii ce nu sunt disponibile în mod curent anterior unei proceduri reconstructive. Acest concept, al necesității unei evaluări riguroase preoperatorii a vascularizației regiunii vizate, este esențial în cazul alotransplanturilor de țesuturi compozite, întrucât acest tip de pacienți au fost supuși, anterior transplantului, unei lungi serii de procedee reconstructive, ducând la modificarea raporturilor anatomice în zona defectului tisular complex. De asemenea acest tip de investigație poate fi utilizată în monitorizarea post-transplant a acestor pacienți pentru evaluarea statusului vascular la nivelul alogrefei compozite, cunoscându-se faptul că în cazul dezvoltării rejecției cronice obliterarea vaselor afectează funcționalitatea și poate duce chiar la pierderea alogrefei.

Datele obținute atât din studiul imagistic cât și din cel anatomo-chirurgical la cadavru, sunt foarte importante, permițându-ne continuarea cercetării și facilitarea translației spre modelele clinice cum ar fi cel de transplant de perete abdominal.

Monitorizarea atentă a rejecției este esențială în cazul VCA, la care componenta tegumentară permite prin simpla inspecție detectarea modificărilor apărute la nivelul alogrefei. Educarea pacienților în acest sens este o responsabilitate a clinicianului.

Trebuie să avem în minte în permanență posibilitatea apariției unor forme atipice de rejet sau a rejetului mediat umoral, aceste situații impunând o sancțiune terapeutică diferită. Diagnosticul clinic al episodului de rejet, confirmat în urma examinării histopatologice a probei bioptice rămân în momentul de față standardul diagnostic al rejecției în VCA.

Episoadele de rejecție acută diagnosticate la timp sunt reversibile în marea majoritate a cazurilor VCA prin administrarea terapiei imunosupresoare adecvate. Un tratament imunosupresor de menținere, bine condus, nu ar trebui să ducă la episoade severe de rejet acut sau la riscul dezvoltării rejetului cronic.

Îmbunătățirea imunosupresiei a fost factorul ce a asigurat progresul în medicina de transplant, având rezultate foarte bune în cazul transplanturilor de organe solide. Momentan însă, în medicina reconstructivă de transplant, neavând o experiență clinică extensivă, precum în cazul transplanturilor de organe, este dificil de făcut o analiză comparativă pentru a obiectiva indicațiile exacte ale fiecărei scheme terapeutice imunosupresoare, fiind necesare trialuri prospective multicentrice pentru a putea standardiza pe viitor terapia imunosupresoare.

Eforturile comunității medicale formate din chirurgii reconstructivi de transplant și imunologi sunt îndreptate mai mult ca oricând spre elaborarea unor strategii de inducere a toleranței imunologice donor-specifică în cazul beneficiarilor transplanturilor de țesuturi compozite, ce ar permite renunțarea la terapia imunosupresoare (implicit fără riscul efectelor adverse ale acesteia), în același timp pacientul păstrând mecanismele naturale de apărare infecțioasă (virală și bacteriană) și antitumorală.

Am urmărit testarea unor strategii protolerogenice în cadrul modelelor experimentale și a unor studii clinice preliminare.

Studiile experimentale efectuate, pe model animal (șobolan) au permis întregii echipe familiarizarea cu tehnicile microchirurgicale în transplantul de țesuturi compozite și evaluarea aspectelor imunologice importante: evaluarea dinamicii rejecției, testarea protocoalelor de imunosupresie și inducere a toleranței imunologice bazate pe microchimerism.

În prima fază am urmărit dezvoltarea unui model experimental optim pentru studiile imunologice. Transplantul de membru pelvin la șobolan este un model frecvent utilizat în studiile imunologice din cadrul transplanturilor tisulare compozite. Transplantul ortotopic de membru pelvin implică timp operator mai îndelungat, prin necesitatea realizării osteosintezei, prezintă rată mai mare a incidentelor operatorii și rezultatelor postoperatorii, cât și dezavantajul nepotrivirii dimensiunilor donorului și receptorului, în concluzie având cea mai mare morbiditate. Transplantul heterotopic de membru pelvin ameliorează o parte a acestor parametri, însă cea mai bună alternativă chirurgicală-modelul animal optim pentru studiile imunologice este transplantarea lambourilor osteomiocutane bazate pe vasele femurale, cu o reducere semnificativă a timpului operator și a timpului de ischemie.

Pentru studiile imunologice ce nu impun prezența în compoziția alogrefei a componentei osoase, o alternativă bună este dată de lamboul epigastric, prin suprafața sa cutanată fiind util pentru

evaluarea modificărilor clinice și histopatologice specifice rejetului. Alotransplantul de perete abdominal este un model experimental laborios, dar cu beneficii potențiale în înțelegerea răspunsului tisular în alotransplanturile complexe.

A fost evaluat rolul alotransplantului măduvei vascularizate, atât ca alternativă la transplantul medular convențional cât și ca strategie protolerogenică bazată pe inducerea chimerismului hematopoietic.

Alotransplantul măduvei vascularizate, având intactă structura sa compozită, incluzând progenitorii hematopoietici și micromediul stromal de suport, este superior în cadrul modelului animal prezentat, transplantului medular convențional, obținându-se o grefare celulară mai robustă la primitorii transplantului ce nu au beneficiat de condiționare prealabilă, cu niveluri prelungite ale microchimerismului.

În ceea ce privește VBMT că potențiala strategie de inducere a toleranței imunologice, au fost determinate niveluri superioare ale microchimerismului la modelul experimental la șobolan ce asociază transplantul ortotopic de membru pelvin cu cel femural contralateral. În cazul asocierii VBMT la alotransplantul de hemifață au putut fi reduse progresiv dozele terapeuțice imunosupresoare, cu păstrarea viabilității alogrefei, sugerând rolul imunomodulator al VBMT. Extinderea pe viitor a studiilor este benefică, în vederea testării unor protocoale noi utilizând VBMT la animale condiționate prin iradiere (utilizând protocolul de condiționare prezentat).

Translatarea datelor către clinic este susținută de fezabilitatea protocolului chirurgical de ridicare a lamboului de creastă iliacă vascularizată și utilizarea sa în procedee de alotransplant.

Utilizarea precursorilor mezenchimali cu origine la nivelul țesutului adipos în protocoale imunomodulatorii este o altă direcție în care vom putea continua cercetarea interdisciplinară.

Plasma îmbogățită în trombocite, prin aportul de factori de creștere și efectele sale imunomodulatorii, reprezintă deja o opțiune viabilă în materie de imunomodulare și dirijare corectă a răspunsului inflamator local, dar și de integrare a diferitelor tipuri de grefe, reprezentând o strategie terapeuțică adjuvantă cu posibilă aplicare și în VCA.

Alotransplantul de trahee ar putea fi utilizat în beneficiul mai multor pacienți cu defecte de căi aeriene, întrucât și-a dovedit eficiența în reconstrucția funcțională și de asemenea a permis sistarea completă, după un timp, a medicației imunosupresoare evitând complicațiile asociate acestor protocoale terapeuțice. Deși extrem de promițător, acest protocol necesită validarea pe un număr mai mare de cazuri.

Ar putea fi luate în discuție, pe viitor și alte strategii cu potențial imunomodulator în VCA (utilizarea precursorilor prezenți la nivelul cordonului ombilical, celulele tecale olfactive) cât și informațiile furnizate în urma utilizării unor tehnologii noi (genomică, proteomică) și analiza complexă a datelor utilizând conceptul de data mining.

Obținerea toleranței imunologice este, în momentul de față, cea mai mare provocare în medicina de transplant. Inducerea toleranței, chiar și toleranței parțiale (permiterea reducerii dozelor medicamentelor imunosupresoare, cu o scădere implicită a reacțiilor adverse), poate oferi mari beneficii atât în privința supraviețuirii alogrefei, cât și a îmbunătățirii calității vieții pacientului. Sunt necesare mai multe studii clinice care să includă un număr mai mare de pacienți pentru a

valida protocoalele imunomodulatorii recente cu perspectiva de implementare în cazul alotransplanturilor vascularizate compozite, inducerea toleranței donor specifice fiind șansa de dezvoltare ulterioară a acestui domeniu cu imens potențial reconstructiv.

Contribuții personale:

Am propus o abordare complexă a problemei imunologice în alotransplantul vascularizat compozit cu analiza unei serii de factori asociați VCA, identificarea relațiilor de cauzalitate între aceste elemente și dinamica răspunsului imun în alotransplant și elaborarea de protocoale și strategii terapeutice ce promovează obținerea unui status pro-tolerogenic la primitorii alotransplanturilor:

- analiza factorilor ce influențează răspunsul imun în VCA cu scopul scăderii riscului de rejecție:
 - propunerea unei strategii diagnostice și terapeutice în cazul defectelor tisulare complexe, în concordanță cu paradigmele reconstructive actuale pentru a asigura managementul corect al acestor cazuri, în scopul obținerii celor mai bune rezultate funcționale și estetice având la dispoziție atât paleta largă a procedurilor reconstructive autologe cât și potențiala utilizare a alotransplantului vascularizat compozit;
 - analiza cazuisticii clinicii noastre cu confirmarea parcurgerii pașilor reconstrucției microchirurgicale utilizând metode autologe, etapa obligatorie înaintea inițierii unui program de alotransplant compozit;
 - identificarea elementelor cheie în selecția pacienților candidați pentru reconstrucție utilizând VCA, analiza preliminară asupra unei serii de cazuri clinice pentru a evalua indicația unor potențiale reconstrucții prin alotransplant compozit și formularea unui protocol general de selecție a primitorilor în alotransplantul vascularizat compozit;
 - studiu clinic de evaluare a pacienților arși ca potențiali candidați pentru reconstrucția defectelor complexe post-combustionale prin alotransplant compozit; evaluarea indicațiilor de reconstrucție, identificarea provocărilor clinice și imunologice asociate acestei categorii de pacienți;
 - elaborarea unui protocol de testare imunologică în VCA;
 - elaborare protocolului de evaluare a infecțiilor în VCA;
 - contribuții personale în vederea pregătirii și efectuării procedurilor chirurgicale de alotransplant vascularizat compozit cu scopul îmbunătățirii rezultatelor funcționale și aspectelor imunologice având drept scop pregătirea pre-operatorie riguroasă pentru a reduce riscul de apariție a sindromului de ischemie-reperfuzie determinant rejecție:
 - studiu imagistic efectuat pe perioada mobilității internaționale din cadrul proiectului POSDRU efectuat în spitalul UZ Leuven, Leuven, Belgia în urma căruia propunem utilizarea angio-computer-tomografiei ca mijloc de evaluare imagistică pre-operatorie în cazul pacienților candidați pentru transplant VCA și perspectiva utilizării acestei investigații în monitorizarea pe termen lung a statusului vascular al alogrefei;
 - evaluarea unui caz clinic în utilizarea angio-RMN pentru evaluarea peretelui abdominal inferior;

- studiul anatomo-chirurgical la cadavru proaspăt asupra peretelui abdominal - etapa preliminară în alotransplantul de perete abdominal;
 - evaluarea antigenicității componentelor alogrefelor vascularizate compozite ilustrată prin experiența clinică în utilizarea alogrefelor tegumentare;
 - propunerea strategiei de monitorizare a rejetului în VCA;
 - propunerea unui protocol terapeutic imunosupresor în VCA;
- promovarea unor strategii protolerogenice în alotransplantul vascularizat compozit;
 - activitate experimentală:
 - analiză model animal adecvat pentru studii imunologice;
 - analiza scalelor de evaluare clinică și histopatologică a rejecției în model experimental de alotransplant vascularizat compozit de membru pelvin la șobolan;
 - studii experimentale privind transplantul de măduvă osoasă vascularizată și chimerismul hematopoietic, cele două direcții de cercetare fiind: transplantul măduvei vascularizate ca alternativă la transplantul celular convențional de măduvă osoasă și utilizarea măduvei vascularizate ca strategie de inducere a toleranței imunologice în alotransplantul vascularizat compozit;
 - evaluarea posibilității translației către practica clinică a unor strategii terapeutice noi în VCA:
 - studiu anatomochirurgical la cadavru și elaborare protocol chirurgical de prelevare a lamboului vascularizat de creastă iliacă pentru utilizare în procedeele de alotransplant;
 - studii preliminare asupra potențialei utilizări a celulelor stem mezenchimale provenite din țesutul adipos ca strategie protolerogenică în VCA: prezentare protocol de extragere a țesutului adipos și de separare a componentelor cât și a protocolului de extragere și cultivare a celulelor mezenchimale adipoase umane pe matrici colagenice;
 - evaluarea utilizării plasmei îmbogățite cu trombocite (PRP) ca strategie imunomodulatorie;
 - studii preliminare asupra alotransplantului de trahee: studiu chirurgical la cadavru proaspăt pentru deprinderea protocolului chirurgical de alotransplant de trahee și studiul experimental preliminar în alotransplantul de trahee la șobolan.

Bibliografie

1. Murray JE. The Establishment of Composite Tissue Allotransplantation as a Clinical Reality, capitol in Hewitt CW(Ed.). Transplantation of Composite Tissue Allografts. Springer 2008.
2. Edtinger K, Yang X, Uehara H, Tullius SG. Current status of vascularized composite tissue allotransplantation. *Burn&Trauma*. 2014;2:53–60.
3. Siemionow M. Impact of reconstructive transplantation on the future of plastic and reconstructive surgery. *Clin Plast Surg*. 2012;39(4):425-34.
4. Brandacher G, Sachs D, Lee WPA .Inaugural Issue of VCA-Vascularized Composite Allotransplantation. *Vascularized Composite Allotransplantation*.2014; 1:1-2.
5. Brandacher G, Khalifian S, Lee WPA. Reconstructive Transplantation: From Scientific Dream to Clinical Reality, capitol in Brandacher G(Ed.) *The Science of Reconstructive Transplantation*. Springer 2015.
6. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G. First hand allograft- Early results. *Chirurgie*. 1999;124(4):358–367.
7. Shores JT, Brandacher G, Lee WPA. Hand and upper extremity transplantation: An update of outcomes in the worldwide experience. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2015; 135(2), 351e-360e.
8. Iyer S. Vascularised composite allotransplants: Transplant of upper extremities and face. *Indian Journal of Plastic Surgery : Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 2015;48(2):111-118.
9. Swearingen B, Ravindra K, Xu H, Wu S, Breidenbach WC, Ildstad ST. The Science of Composite Tissue Allotransplantation. *Transplantation*. 2008;86(5):627-635.
10. Diaz-Siso JR, Bueno EM, Sisk GC, Marty FM, Pomahac B, Tullius SG. Vascularized composite tissue allotransplantation-state of the art. *Clin Transplant*. 2013;27(3):330-7
11. Ravindra KV, Xu H, Bozolic LD, Song DD, Ildstad ST. The Need for Inducing Tolerance in Vascularized Composite Allotransplantation. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012; doi:10.1155/2012/438078.
12. Huang WC, Lin JY, Wallace CG, Wei FC, Liao SK. Improving the safety of tolerance induction: chimerism and cellular co-treatment strategies applied to vascularized composite allografts. *Clin Dev Immunol*. 2012;doi: 10.1155/2012/107901.
13. Eun SC. Composite Tissue Allotransplantation Immunology. *Archives of Plastic Surgery*. 2013;40(2):141-153.
14. Unadkat J , Sacks J M, Schneeberger S, Lee W PA. Relative Antigenicity of Allograft Components and Differential Rejection, capitol in Hewitt CW(Ed.), *Transplantation of Composite Tissue Allografts*. Springer 2008.
15. Siemionow M, Ozer K. Advances in composite tissue allograft transplantation as related to the hand and upper extremity. *J Hand Surg Am*. 2002;27(4):565-80
16. Organ Procurement and Transplantation Network, disponibil pe https://optn.transplant.hrsa.gov/media/1118/05_vca_implementation.pdf.
17. International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation, disponibil pe <https://www.handregistry.com/>
18. Schneeberger S, Morelon E, Landin L, ESOT CTA Committee. Vascularized composite allotransplantation: a member of the transplant family? *Transplantation*. 2012; 15;93 (11):1088-91.
19. Petruzzo P, Dubernard JM. Current Status of CTA, capitol in Orlando G(Editor). *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. Elsevier 2014.
20. Cendales LC, Rahmel A, Pruett TL. Allocation of vascularized composite allografts: what is it? *Transplantation*. 2012 15;93(11):1086-7.
21. Weissenbacher A, Hautz T, Pratschke J, Schneeberger S. Vascularized composite allografts and solid organ transplants: similarities and differences. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(6):640-4.
22. Ravindra K. Unique immunological feautres of vascularized composite allografts, capitol in Brandacher G. (Ed.) *The Science of Reconstructive Transplantation*. Springer 2015.
23. Murray JE. Organ transplantation (skin, kidney, heart) and the plastic surgeon. *Plast Reconstr Surg*. 1971;47(5):425-31.

24. Morelon E, Kanitakis J, Petruzzo P, Badet L, Thaunat O. Immunological Challenges in Vascularised Composite Allotransplantation. *Curr Transpl Rep*. 2015; 2:276-283
25. Ravindra KV, Ildstad ST. Immunosuppressive protocols and immunological challenges related to hand transplantation. *Hand Clin*. 2011;27(4):467-79.
26. Eghthesad B, Fung JJ. Immunosuppression in Composite Tissue Allotransplantation, capitol în Siemionow M(Editor). *The Know-How of Face Transplantation*, Springer-Verlag Londra 2011.
27. Brandacher G. Immunosuppression in VCA: Are They Different From Other Organ Transplants?, prezentare la World Transplant Congress, San Francisco 2014, disponibil pe <http://www.tts.org/>
28. Kovarik J. From immunosuppression to immunomodulation: current principles and future strategies. *Pathobiology*. 2013;80(6):275-81.
29. Schroeder RA, Marroquin CE, Kuo PC. Tolerance and the "Holy Grail" of transplantation. *J Surg Res*. 2003;111(1):109-19.
30. Page EK, Dar WA, Knechtle SJ. Tolerogenic therapies in transplantation. *Frontiers in Immunology*. 2012;3:198
31. Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity*. 2001;14(4):407-16.
32. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(2):88-96.
33. Taylor AW. Ocular immune privilege, *Eye*. 2009; 23, 1885–1889.
34. Arzi B, DuRaine G.D, Lee C.A, Huey DJ, Borjesson DL, Murphy BG, Hu JC, Baumgarth N, Athanasiou KA. Cartilage immunoprivilege depends on donor source and lesion location. *Acta Biomater*. 2015;23:72-81.
35. Salama AD, Remuzzi G, Harmon WE, Sayegh MH. Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(7):943-948.
36. Siemionow M, Zor F. Burn reconstruction-Future perspectives: Facial transplantation, capitol în Kamolz L-P(Ed). *Handbook of Burns Volume 2: Reconstruction and Rehabilitation*. Springer 2012
37. Klein HJ, Schanz U, Hivelin M, Waldner M, Koljonen V, Guggenheim M, Giovanoli P, Gorantla VS, Fehr T, Plock JA. Sensitization and desensitization of burn patients as potential candidates for vascularized composite allotransplantation. *Burns*. 2016;42(2):246-57
38. Gaucher S, Jarraya M. Anti-HLA sensitization: should we abandon skin allografts for extensively burned patients? *Transpl Int*. 2015;28(10):1227-8.
39. Askar M. Immunological Monitoring, capitol în Siemionow MZ(Editor). *The Know-How of Face Transplantation*. Springer 2011.
40. Diagnostic Imunologic Institutul Clinic Fundeni, disponibil pe <http://icfundeni.ro/laborator-analize-medicale-ii/diagnostic-imunologic>
41. Constantinescu I. *Imunologia transplantului*. Editura Universitară "Carol Davila", Bucuresti 2009.
42. The Transplantation Society, Education, disponibil pe <https://www.tts.org/education>.
43. Tien HY, Manon-Matos Y, Tsai TM, Kaufman C, Kutz JE. Clinical Pearls and Pitfalls in Reconstructive Transplantation capitol în in Brandacher G(Ed.). *The Science of Reconstructive Transplantation*. Springer 2015
44. Caterson EJ, Lopez J, Medina M, Pomahac B, Tullius SG. Ischemia-reperfusion injury in vascularized composite allotransplantation. *J Craniofac Surg*. 2013;24(1):51–6.
45. Hollenbeck ST, Senghaas A, Turley R, Ravindra KV, Zenn MR, Levin LS, Erdmann D. The extended abdominal wall flap for transplantation. *Transplant Proc*. 2011;43(5):1701-5.
46. Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:532127. doi: 10.1155/2011/532127
47. Kupiec-Weglinski JW, Azari K. Ischemia–Reperfusion Injury in Reconstructive Transplantation: An Undefined Conundrum, capitol în Brandacher G(Ed.) *The Science of Reconstructive Transplantation*. Springer 2015.
48. Ministerul Sănătății, Legislație în vigoare, disponibil pe <http://www.ms.ro>.
49. Agenția Europeană a Medicamentului(EMA), disponibil pe <http://www.ema.europa.eu/ema/>.

50. Agenția Națională a Medicamentului și a Dispozitivelor Medicale, disponibil pe <http://www.anm.ro>.
51. Zor F, Siemionow M. Vascularized Composite Allotransplantation Models, capitol în Siemionow M(Editor). *Plastic and Reconstructive Surgery: Experimental Models and Research Designs*. Springer 2015
52. Nasir S. Abdominal Wall Transplant Models, capitol în Siemionow M(Editor). *Plastic and Reconstructive Surgery: Experimental Models and Research Designs*. Springer 2015.
53. Lao WW, Wang Y-L, Ramirez AE, Cheng H-Y, Wei F-C. A New Rat Model for Orthotopic Abdominal Wall Allotransplantation. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*. 2014;2(4):e136.
54. Zamfirescu DG, Owen E, Lascăr I, Molitor M, Zegrea I, Popescu M, Bishop GA, Lauer CA, Simionescu M, Klimov M, Lanzetta M. Sentinel skin allograft-a reliable marker for monitoring of composite tissue transplant rejection. *Transplant Proc*. 2009; 41(2):503-8.
55. Zamfirescu DG, Lascăr I, Lanzetta M. Sentinel Skin Allograft for Monitoring of Composite Tissue Transplants Rejection, capitol în Spear M(Ed.). *Skin Grafts - Indications, Applications and Current Research*. InTech 2011.
56. Zamfirescu D, Popoviciu C, Ștefanescu A, Bularda A, Popescu M, Zegrea I, et al. Vascularized bone marrow transplantation model in rats as an alternative to conventional cellular bone marrow transplantation: preliminary results. *Transplant Proc*. 2011; 43(9): 3549-51.
57. Zamfirescu D, Klimov M, Bularda A, Zegrea I, Popescu M, Popoviciu C, Ștefanescu A, Lupu A, Simionescu M, Lanzetta M, Lascăr I. LOP38: Vascularized bone marrow transplantation induced partial tolerance to hemiface transplantation in rats. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2011. Vol.128, Issue LOP38, pag.627(European PSRC Abstracts Supplement: Abstracts).
58. Lanzetta M, Kubitskiy A, Bishop GA, Mc Caughan. Simultaneous Vascularised Bone Marrow Transplantation to Promote Acceptance of Limb Allografts, capitol în Lanzetta M, Dubernard JM, Petruzzo P(Editori). *Hand Transplantation*. Springer-Verlag 2007.
59. Pilat N, Wekerle T. Transplantation tolerance through mixed chimerism. *Nature Reviews Nephrology*. 2010; 6, 594-605.
60. Chandran S. Innovative Trial Designs in Tolerance Studies. How will efficacy be demonstrated? prezentare orală la Al 26-lea Congres Internațional al Societății de Transplant TTS 2016, disponibil pe www.tts.org
61. Schneeberger S, Gorantla VS, Brandacher G, et al. Upper-Extremity Transplantation Using a Cell-Based Protocol to Minimize Immunosuppression. *Annals of surgery*. 2013;257(2):345-351.
62. Donnenberg AD, Gorantla VS, Schneeberger S, et al. Clinical implementation of a procedure to prepare bone marrow cells from cadaveric vertebral bodies. *Regenerative medicine*. 2011;6(6):701-706.
63. Del Bene M, Di Caprio AP, Melzi ML, Pioltelli PE, Bonomi S. Autologous mesenchymal stem cells as a new strategy in immunosuppressant therapy in double hand allotransplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2013;131(2):305e-307e
64. Feisst V, Meidinger S, Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. 2015;8:149-162.
65. Pallua N, Wolter T, Markowicz M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns*. 2010; 36(1):4-8.
66. Marck RE, Middelkoop E, Breederveld RS. Considerations on the use of platelet-rich plasma, specifically for burn treatment. *J Burn Care Res*. 2014;35(3):219-27.
67. Ozcelik U, Ekici Y, Bircan HY, Aydogan C, Turkoglu S, Ozen O, et al. Effect of Topical Platelet-Rich Plasma on Burn Healing After Partial-Thickness Burn Injury. *Med Sci Monit*. 2016;22:1903-9.
68. Venter NG, Marques RG, Santos JSD, Monte-Alto-Costa A. Use of platelet-rich plasma in deep second- and third-degree burns. *Burns*. 2016;42(4):807-14.
69. Marck RE, Gardien KLM, Stekelenburg CM, Vehmeijer M, Baas D, Tuinebreijer WE, et al. The application of platelet-rich plasma in the treatment of deep dermal burns: A randomized, double-blind, intra-patient controlled study. *Wound Repair Regen*. 2016;24(4):712-20.
70. Picard F, Hersant B, Bosc R, Meningaud J-P. Should we use platelet-rich plasma as an adjunct therapy to treat „acute wounds,” „burns,” and „laser therapies”: A review and a proposal of a quality criteria checklist for further studies. *Wound Repair Regen*. 2015;23(2):163-70

71. Delaere PR, Vranckx JJ, Meulemans J, Vander Poorten V, Segers K, Van Raemdonck D, De Leyn P, Decaluwé H, Doooms C, Verleden G. Learning curve in tracheal allotransplantation. *Am J Transplant.* 2012;12(9):2538-45.
72. Delaere PR. Tracheal transplantation. *Curr Opin Pulm Med.* 2012;18(4):313-20
73. Global Observatory on Donation and Transplantation-Reports, disponibil pe <http://www.transplant-observatory.org/reports/>.
74. OPTN, National Data, disponibil pe <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/>.
75. Kueckelhaus M, Fischer S, Seyda M, Bueno E M, Aycart M A, Alhefzi M, Elkhali A, Pomahac B, Tullius SG. Vascularized composite allotransplantation: current standards and novel approaches to prevent acute rejection and chronic allograft deterioration. *Transplant International.* 2016; 29: 655–662.
76. Kaufman CL, Marvin MR, Chilton PM et al. Immunobiology in VCA. *Transpl Int.*2016; 29: 644–654.
77. Morelon E, Thauinat O, Kaniakakis J. Advances in diagnosing skin rejection and immune monitoring, capitol în Brandacher G. (Ed.) *The Science of Reconstructive Transplantation.* Springer 2015.
78. Lázaro A, Humanes B, Jado JC, et al. Beneficial Effect of Short Pretransplant Period of Hypothermic Pulsatile Perfusion of the Warm-Ischemic Kidney after Cold Storage: Experimental Study. *BioMed Research International.* 2016;2016:2518626. doi:10.1155/2016/2518626.
79. Zein NN, Hanouneh IA, Bishop PD, Samaan M, Eghtesad B, Quintini C, Miller C, Yerian L, Klatte R. Three-dimensional print of a liver for preoperative planning in living donor liver transplantation. *Liver Transpl.* 2013;19(12):1304-10.
80. Gálvez JA, Gralowski K, McAndrew C, Rehman MA, Chang B, Levin LS. Assessment and Planning for a Pediatric Bilateral Hand Transplant Using 3-Dimensional Modeling: Case Report. *J Hand Surg Am.* 2016;41(3):341-3.
81. Kaniakakis J, Cendales LC. Classification of Face Rejection: Banff classification for CTA, capitol în Siemionow MZ(Editor). *The Know-How of Face Transplantation.* Springer 2011.
82. Petruzzo P. The International Registry on Hand and Composite Tissue Allotransplantation (IRHCTT), prezentare la 26th International Congress of The Transplantation Society .2016, disponibil pe www.tts.org
83. Ceulemans LJ, Braza F, Monbaliu D, Jochmans I, De Hertogh G, Du Plessis J, Emonds M-P, Kitade H, Kawai M, Y Li, Zhao X, Koshiba T, Sprangers B, Brouard S, Waer M & Pirenne J. The Leuven Immunomodulatory Protocol Promotes T-Regulatory Cells and Substantially Prolongs Survival After First Intestinal Transplantation. *Am J Transplant.* 2016. doi: 10.1111/ajt.13815