

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

# Προμεταμοσχευτικός ανοσολογικός έλεγχος στην μεταμόσχευση νεφρού

Ariola Baro (A.M. 09022)

Εισηγητής: Δρ. Κριεμπάρδης Αναστάσιος  
Καθηγητής εφαρμογών Αιματολογίας - Αιμοδοσίας

ΑΘΗΝΑ, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2013

TECHNOLOGICAL EDUCATIONAL INSTITUTE OF ATHENS  
FACULTY OF HEALTH AND CARING PROFESSIONS  
DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES

# Pre-transplant immunological control in kidney transplant

Ariola Baro (R. N. 09022)

Supervisor: Dr. Kriebardis Anastasios  
Lecture of Hematology and Transfusion

ATHENS, NOVEMBER 2013

## Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής υλοποιήθηκε με την υποστήριξη ενός αριθμού ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου. Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και εισηγητή Δρ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο ο οποίος με ιδιαίτερη υπομονή, διέθεσε τον πολύτιμο χρόνο του για την υλοποίηση και περάτωση τις παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να αναφερθώ & να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Ιστοσυμβατότητας του Γενικού Νοσοκομείου «Γ. Γεννηματάς» και ιδιαίτερα την κ. Αποστολάκη Μαρία για την πολύτιμη βοήθεια τους, τόσο στην κατανόηση κάποιων δυσνόητων εννοιών και τεχνικών, όσο και για την επίδειξη στην πράξη των πρωτοκόλλων εργασίας.

Νοέμβριος 2013

## Συντμήσεις

E.O.M	Εθνικός Οργανισμός Μεταμοσχεύσεων
M.E.Θ	Μονάδα εντατικής θεραπείας
M.T.N	Μονάδες τεχνητού νεφρού
Π. Ε	Προμεταμοσχευτικός έλεγχος
ΣΕΛ	Συστηματικός Ερυθριματώδης Λύκος
ΣΔ	Σακχαρώδης Διαβήτης
XNM	Χρόνια Νεφροπάθεια Μοσχεύματος
XNN	Χρόνια Νεφρική Νόσος
AHG-CDC	Anti-human globulin augmented (δοκιμασία κυτταροτοξικότητας εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα
APCs	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
CDC	Complement Dependent Lymprocytotoxicity (μικρολεμφοκυτταροτοξική μέθοδος)
CMV	Κυτταρομεγαλοϊός
DNA	Deoxyribonucleic acid (δεσοξυριβονουκλεϊνικό όξύ)
Dsa	Donor specific antibody (ειδικά έναντι του δότη αντισώματα)
dNTPs	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουλεοτίδια
FC-AHG	Flow cytometry crossmatch with anti-human globulin serum (κυτταρομετρική δοκιμασία διασταύρωσης)
GFR	Glomerular Filtration Rate (Ρυθμός σπειραματικής διήθησης)
HBV	Ηπατίτιδα Β
HCV	Ηπατίτιδα C

HIV	Human immunodeficiency virus (Ιός της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου)
INF-γ	γ- ιντερφερόνη
HLA	Human Leukocyte Antigens
MHC	Major Complex Histocompatibility (Μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας)
mH	Minor histocompatibility loci
PCR	Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης)
PRA	Panel reactive antibody
SSO	Sequence Specific Oligonucleotides (Ειδικής αλληλουχίας ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές)
TcR	Υποδοχέας του T-κυττάρου (T cell receptor)
TNF	Νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor)

## Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Φυσιολογία νεφρών .....	3
1.1.1 Ανατομία .....	6
1.1.2. Λειτουργίες .....	6
1.1.3. Εργαστηριακή Εκτίμηση Νεφρικής Λειτουργίας.....	7
1.2. Χρόνια Νεφρική Νόσος ή Ανεπάρκεια .....	7
1.2.1 Αιτιολογία χρόνιας νεφρικής νόσου .....	9
1.2.2. Διάγνωση– Αντιμετώπιση .....	11
1.3 Η μεταμόσχευση νεφρού .....	12
1.3.1 Διαδικασία επιλογής.....	13
1.3.2. Ζώντες δότες .....	15
1.3.3. Πτωματικοί δότες.....	16
1.3.4. Η μεταμόσχευση στην Ελλάδα.....	17
1.3.5. Διατήρηση μοσχευμάτων.....	19
2. Ανοσολογικός Έλεγχος στη Μεταμόσχευση Νεφρού .....	21
2.1. Μείζονα και Ελάσσονα Αντιγόνα Ιστοσυμβατότητας .....	21
2.1.1. Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC) .....	21
2.1.2. Γενετική του συστήματος HLA.....	22
2.1.3. Δομή των HLA γονιδίων και μορίων .....	25
2.1.4. Ονοματολογία και κληρονομικότητα των HLA μορίων .....	29
2.1.5. Ελάσσονα Συστήματα Ιστοσυμβατότητας.....	30
2.2. Σύστημα ABO .....	32
2.1. ABO Συμβατότητα .....	32
2.2. ABO Ασυμβατότητα.....	33
2.3. Προσηματισμένα ειδικά έναντι του δότη αντισώματα .....	35
3. Προμεταμοσχευτικός Ανοσολογικός Έλεγχος στη Μεταμόσχευση Νεφρού.....	37
3.1. Τεχνικές τυποποίησης HLA μορίων .....	38
3.1.1 Ορολογική τυποποίηση HLA αντιγόνων με μικρολεμφοκυτταροτοξική τεχνική (Complement-Dependent Lymphocytotoxicity, CDC).....	40
3.1.2. Μοριακή τυποποίηση HLA αντιγόνων με PCR τεχνική και χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων.....	42
3.2. Έλεγχος HLA αντισωμάτων.....	51

3.2.1. Κυτταρικές δοκιμασίες.....	51
3.2.2. Δοκιμασίες στερεής φάσης.....	55
3.3. Δοκιμασία Διασταύρωσης ( crossmatch) στη Μεταμόσχευση Νεφρού.....	56
3.3.1. Τεχνική Crossmatch.....	57
4. Μεταμοσχεύτικός έλεγχος.....	61
4.1. Υπεροξεία απόρριψη.....	62
4.2. Οξεία απόρριψη.....	63
4.3. Χρόνια απόρριψη.....	64
5. Προβληματισμοί – Προοπτικές.....	66
Περίληψη.....	67
Abstract.....	68
Βιβλιογραφία.....	69

## 1. Εισαγωγή

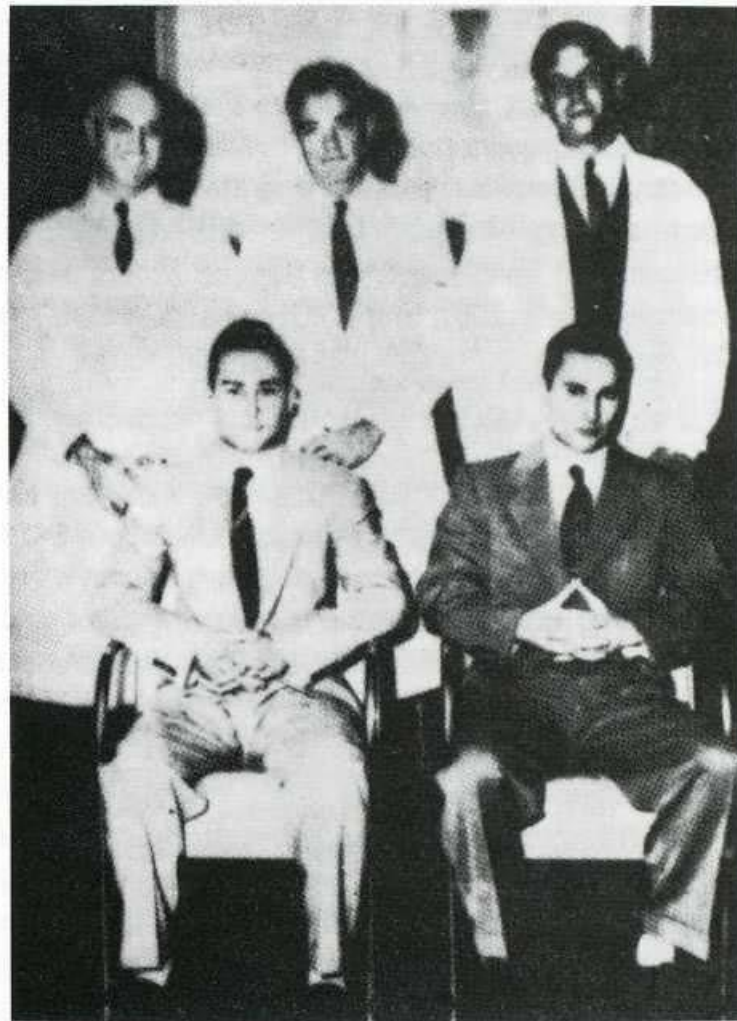
Η μεταμόσχευση οργάνων αποτελεί έναν ελκυστικό και ιδιαίτερα σημαντικό τομέα της μοντέρνας ιατρικής, ο οποίος παρουσιάζει τεράστιο κλινικό και ερευνητικό ενδιαφέρον. Το ενδιαφέρον αυτό απορρέει από την προσπάθεια κατανόησης και ερμηνείας των μηχανισμών εκείνων του ανοσιακού συστήματος, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την αναγνώριση του «ίδιου» (self) από του «ξένου» (non self) και οι οποίοι τελικά οδηγούν στην καταστροφή του αλλομοσχεύματος. Η επιτυχημένη μεταμόσχευση οργάνων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την «αποδοχή» του μεταμοσχευμένου οργάνου από το λήπτη και είναι αποτέλεσμα «διαφοροποίησης» των μηχανισμών αλλοαναγνώρισης.

Η μελέτη της συμπεριφοράς των κακοηθών όγκων βοήθησε σημαντικά στην ανάπτυξη της ανοσολογίας των μεταμοσχεύσεων. Οι παρατηρήσεις ομάδων ερευνητών για τη γενετική βάση της απόρριψης οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η απόρριψη των όγκων εξαρτάται από τα αντιγόνα με μεγάλο πολυμορφισμό, τα οποία βρίσκονται σε φυσιολογικούς ιστούς (Γερμένης, 2000). Η μελέτη από τον G. Snell των αντιγονικών αυτών στοιχείων στον ποντικό είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη των γενετικών τόπων (loci) που καθιστούν τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας υπεύθυνα, σε μεγάλο ποσοστό, για την απόρριψη του μοσχεύματος (<http://www.nobelprize.org>). Το αντίστοιχο σύστημα στον άνθρωπο περιγράφηκε από τον J. Dausset το 1958 (Dausset, 1958). Τις δεκαετίες που ακολούθησαν και ιδιαίτερα τη δεκαετία του '70, οι πρωτοποριακές εργασίες του B. Benacerraf έδωσαν το Νόμπελ ιατρικής στους παραπάνω ερευνητές. Στη συνέχεια, η εντατική έρευνα και η βοήθεια της τεχνολογίας βοήθησαν στο να αποκαλυφτεί ο τεράστιος βιολογικός ρόλος του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) (Benacerraf, 1980).

Η επιτυχία ή η αποτυχία της μεταμόσχευσης ενός οργάνου προϋποθέτει την αναγνώριση ή όχι των κυττάρων του δότη από το ανοσιακό σύστημα του λήπτη. Τα κύρια μόρια που εισέρχονται στους μηχανισμούς αλλοαναγνώρισης είναι τα μείζονα και τα ελάσσονα συστήματα ιστοσυμβατότητας, διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί



(λεμφοκύτταρα, μακροφάγα), τα μόρια προσκόλλησης, οι κυτταροκίνες και οι ανοσοσφαιρίνες. Πολύ σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του μοσχεύματος παίζει η ευαισθητοποίηση του λήπτη, δηλαδή η ανάπτυξη κυτταροτοξικών αντισωμάτων, ως αποτέλεσμα μεταγίσεων, κήσεων ή απόρριψης αλλομοσχεύματος (Bodmer, 1987).



**Εικόνα 1.** Οι μονοωογενείς δίδυμοι, μεταξύ των οποίων έγινε, το 1954, η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση νεφρού από τους J.H. Harrison (πρώτος πάνω δεξιά) και J.E. Murray (πρώτος πάνω αριστερά). Ο τελευταίος τιμήθηκε το 1990 με το Βραβείο Nobel. Ο ασθενής πέθανε οκτώ χρόνια μετά από την μεταμόσχευση, από στεφανιαία νόσο, (Ανατύπωση από Α. Γερμένης, 2000).

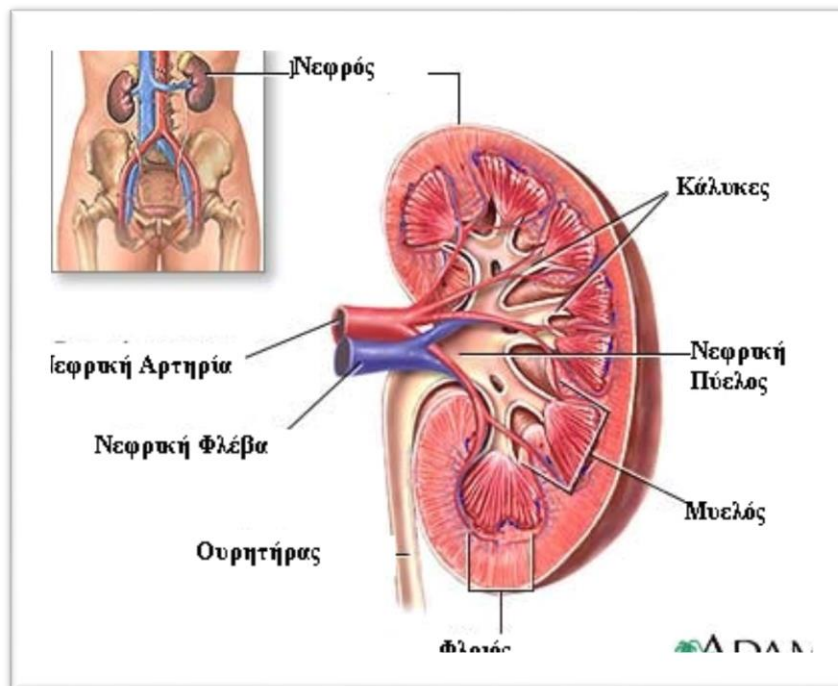
## Ιστορική αναδρομή

- 1902: Στην Ιατρική Σχολή της Βιέννης στην Αυστρία έγιναν οι πρώτες επιτυχημένες μεταμοσχεύσεις σε ζώα.
- 1909: Στην Γαλλία έγιναν τα πρώτα πειράματα μεταμόσχευσης νεφρού σε ανθρώπους χρησιμοποιώντας νεφρούς από ζώα.
- 1933: Λόγω μη συμβατότητας του μοσχεύματος απέτυχε η πρώτη μεταμόσχευση νεφρού από άνθρωπο σε άνθρωπο (άγνωστη έως τότε η συμβατότητα).
- 1940: Στο Πανεπιστήμιο του Λονδίνου, ο Sir P. Medawar πειραματίζεται με την ανοσολογική πλευρά της απόρριψης οργάνων.
- Αρχές του '50: Τα φάρμακα με βάση την κορτιζόνη χρησιμοποιούνται για την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού, οδηγώντας σε επιτυχή μεταμόσχευση νεφρού.
- 1954: Στο νοσοκομείο Peter Bent Brigham της Βοστώνης, ο J. Murray και οι συνεργάτες του επιτυγχάνουν την πρώτη μεταμόσχευση νεφρού ανάμεσα σε δίδυμα αδέρφια, χωρίς τη χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων.
- Δεκαετία '60: Οι τεχνικές ιστοσυμβατότητας εξελίχθηκαν.
- 1961: Η συνδυαστική χρήση δυνατών ανοσοκατασταλτικών, έδωσε ώθηση στις μεταμοσχεύσεις νεφρού.
- Δεκαετίες '80 και '90: Νέες τεχνικές και νέα φάρμακα έκαναν τις μεταμοσχεύσεις πιο ασφαλείς και αποτελεσματικές (<http://www.ene.gr>).

## 1.1. Φυσιολογία νεφρών

### 1.1.1 Ανατομία

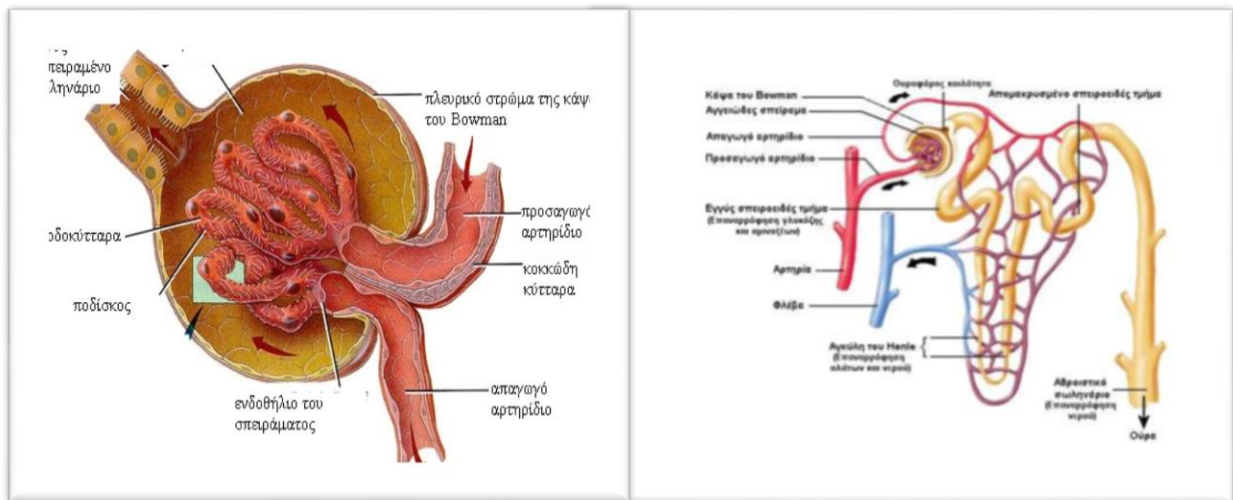
Οι νεφροί βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο περιβαλλόμενοι από μία μεμβράνη ανελαστικού συνδετικού ιστού (κάψα). Από την πύλη κάθε νεφρού εισέρχεται η νεφρική αρτηρία και εξέρχονται η νεφρική φλέβα, η πύελος και τα λεμφαγγεία, με τους νεφρούς να δέχονται κατά προσέγγιση το 25% της καρδιακής παροχής. Μέσα στο νεφρό, η νεφρική αρτηρία και φλέβα διακλαδίζονται σε μικρότερα αγγεία και η πύελος διαιρείται στους κάλυκες (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Ανατομία του νεφρού, (Ανατύπωση από <http://health.allrefer.com/health/kidney-transplant-kidney-anatomy-1.html>)

Ανατομική μονάδα της νεφρικής λειτουργίας, είναι ο νεφρώνας, με κάθε νεφρό να περιέχει περίπου 1 εκατομμύριο τέτοιες μονάδες. Ο νεφρώνας αποτελείται από το σπείραμα, ένα θύσανο τριχοειδών αγγείων όπου διηθείται το αίμα, και το ουροφόρο σωληνάριο όπου λαμβάνουν χώρα διαδικασίες προσθαιρέσεως ουσιών

στο εξερχόμενο από το σπείραμα υπερδιήθημα, το οποίο τελικά καταλήγει στην πύελο και από εκεί μέσω των ουρητήρων στην ουροδόχο κύστη για αποβολή από τον οργανισμό (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ανατομία του νεφρώνα, (Ανατύπωση από <http://biology.net.wordpress.com/2012/01/31/96/>)

Από λειτουργικής άποψης, το ουροφόρο σωληνάριο μπορεί να διακριθεί (i) στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο όπου επαναρροφάται η μεγαλύτερη ποσότητα του συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης, της ουρίας και σημαντικής ποσότητας ύδατος και ηλεκτρολυτών (ii) στην αγκυλή του Henle όπου λαμβάνει χώρα η οσμωτική (μέσω μετακίνησης νατρίου) ρύθμιση της επαναρρόφησης του ύδατος και του καλίου (iii) στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο που αποτελεί τη συνέχεια του αγκυλωτού σωληναρίου και τέλος (iv) στο αθροιστικό σωληνάριο, περιοχή της ορμονικά ρυθμιζόμενης επαναρρόφησης του νατρίου και του ύδατος και έκκρισης του καλίου και κατ' επέκταση περιοχή της τελικής συμπίκνωσης των ούρων (McPhee et al. 2000, Vander et al. 2001).

### 1.1.2. Λειτουργίες

Οι νεφροί παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης του ύδατος και των ηλεκτρολυτών, άρα κατ' επέκταση και του όγκου του εσωτερικού περιβάλλοντος, λειτουργία που πραγματοποιείται με τους μηχανισμούς της σπειραματικής διήθησης και σωληναριακής έκκρισης και επαναρρόφησης. Παρομοίως οι νεφροί απομακρύνουν από τον οργανισμό μέσω των ούρων μεταβολικά παραπροϊόντα όπως η ουρία, η κρεατινίνη και διάφορες άλλες αζωτούχες ενώσεις, καθώς και εξωγενείς χημικές ουσίες (φάρμακα, συντηρητικά τροφίμων κ.α.).

Οι νεφροί επιτελούν επίσης σημαντικές ενδοκρινικές λειτουργίες. Εκκρίνουν τη ρενίνη, ένα ένζυμο το οποίο παρουσία μειωμένου όγκου πλάσματος -που μεταξύ άλλων οδηγεί σε πτώση της αρτηριακής πίεσης και του ρυθμού σπειραματικής διήθησης- αυξάνει τα επίπεδα της αγγιοτενσίνης I, άρα και εμμέσως του προϊόντος διάσπασής της, της αγγιοτενσίνης II. Η αγγιοτενσίνη II με τη σειρά της διεγείρει την επινεφριδιακή έκκριση αλδοστερόνης, μίας ορμόνης που επιδρώντας στα νεφρικά αθροιστικά σωληνάκια επιφέρει τελικά μείωση της αποβολής νατρίου από τα ούρα. Οι νεφροί -σε άρρηκτη συνεργασία με την παραθορμόνη (parathormone - PTH) - συμβάλλουν επίσης στη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων ασβεστίου στο αίμα, με τον ενδοκρινικό τους ρόλο να εστιάζει στο τελικό στάδιο παραγωγής της δραστικής μορφής της βιταμίνης D [1,25-διυδροξυβιταμίνη D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] η οποία αυξάνει την εντερική απορρόφηση ασβεστίου. Τέλος από τους νεφρούς εκκρίνεται η ορμόνη ερυθροποιητίνη, που δρώντας στο μυελό των οστών διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών ερυθροκυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε ώριμα, αποτελώντας έτσι κύριο ελεγκτικό μηχανισμό της ερυθροποίησης.

Στις νεφρικές λειτουργίες συγκαταλέγεται και η συνεισφορά τους, τόσο στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας, μέσω ρύθμισης της συγκέντρωσης των διττανθρακικών στο πλάσμα επομένως και συντήρησης της εκεί συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου, όσο και στον ενεργειακό μεταβολισμό και συγκεκριμένα στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης υπό συνθήκες παρατεταμένης νηστείας (Vander et al. 2001).

### **1.1.3. Εργαστηριακή Εκτίμηση Νεφρικής Λειτουργίας**

Εκτός των επεμβατικών (βιοψία) και απεικονιστικών εξετάσεων (υπέρηχος, πυελογραφία, ακτινογραφία, αξονική/μαγνητική τομογραφία), που δίνουν εκτεταμένες πληροφορίες σε υποψία νεφρικής βλάβης, εκτίμηση ρουτίνας της νεφρικής λειτουργίας μπορεί να γίνει εύκολα και γρήγορα με μία εξέταση στο αίμα των επιπέδων κρεατινίνης, ουρίας και ουρικού οξέος, ουσίες που ως αζωτούχα παραπροϊόντα του μεταβολισμού αναμένεται φυσιολογικά να αποβάλλονται από τα ούρα, αλλά σε συνθήκες δυσλειτουργίας των νεφρών συσσωρεύονται στο αίμα. Παρομοίως, από μία γενική εξέταση ούρων μπορεί να αξιολογηθεί η συγκέντρωση κάποιων ουσιών, όπως για παράδειγμα των πρωτεϊνών, οι οποίες στον υγιή νεφρό δε διηθούνται, άρα φυσιολογικά απουσιάζουν από τα ούρα.

Μία πιο σύνθετη υπολογιστικά, αλλά βασιζόμενη στην προαναφερόμενη μέτρηση της κρεατινίνης διαγνωστική δοκιμή, είναι η εκτίμηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate -GFR), ο οποίος, δεδομένου ότι προκύπτει από το άθροισμα των ρυθμών διήθησης των επιμέρους νεφρώνων, αντικατοπτρίζει τη λειτουργική νεφρική μάζα, άρα και το συνολικό επίπεδο της νεφρικής λειτουργίας. Για τον υπολογισμό του εκτιμώμενου GFR (estimated GFR - eGFR) έχουν αναπτυχθεί διάφορες εξισώσεις που λαμβάνουν υπόψη τους -εκτός της συγκέντρωσης κρεατινίνης στον ορό- και μεταβλητές όπως η ηλικία, το φύλο, η φυλή, το σωματικό βάρος (ΣΒ) (Vander et al. 2001).

## **1.2. Χρόνια Νεφρική Νόσος ή Ανεπάρκεια**

Η χρόνια νεφρική νόσος (XNN) είναι μια πάθηση που χαρακτηρίζεται από σταδιακή απώλεια της νεφρικής λειτουργίας με την πάροδο του χρόνου, όπου εύστοχα έχει χαρακτηριστεί ως μια «σιωπηλή» νόσος, καθώς πολλοί πάσχοντες δε γνωρίζουν ότι έχουν προσβληθεί παρά μόνο όταν βρίσκονται στα τελευταία στάδια της. Η παρουσία της XNN επιβεβαιώνεται από την παρουσία της νεφρικής βλάβης και από το ρυθμό σπειραματικής διήθησης (GFR) ανεξάρτητα από την αιτία.

Πριν από μία περίπου δεκαετία η KDOQI<sup>1</sup> (δημοσίευσε κάποια κριτήρια για τον ορισμό και την κατηγοριοποίηση της ΧΝΝ, τα οποία -με κάποιες μικρές τροποποιήσεις τους λίγο αργότερα από το KDIGO<sup>2</sup> - είναι αυτά που χρησιμοποιούνται έως σήμερα τόσο σε ερευνητικό επίπεδο όσο και στην κλινική πράξη (Πίνακας 1. α, Πίνακας 1. β).

Πίνακας 1 .α : Ορισμός Σταδίων Χρόνιας Νεφρικής Νόσου, (Ανατύπωση από Levey, 2002)

Δομικές ή λειτουργικές διαταραχές των νεφρών για $\geq 3$ μήνες, όπως αυτές δηλώνονται από :
1. Νεφρική βλάβη με ή χωρίς μείωση του GFR όπως αυτή καθορίζεται από: I. Παθολογικές διαταραχές II. Δείκτες νεφρικής βλάβης <ul style="list-style-type: none"><li>• Διαταραχές στη σύσταση των ούρων (πρωτεϊνουρία)</li><li>• Διαταραχές στη σύσταση του αίματος (νεφρικά σωληναριακά σύνδρομα)</li><li>• Διαταραχές στις απεικονιστικές εξετάσεις</li></ul>
II. Μεταμόσχευση νεφρού
2. GFR $<60$ mL/min/1,73m <sup>2</sup> με ή χωρίς νεφρική βλάβη

<sup>1</sup> Η Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI™) του National Kidney Foundation NFK) παρέχει επιστημονικά τεκμηριωμένες οδηγίες κλινικής πρακτικής οι οποίες συντάσσονται από μια ομάδα εθελοντών ιατρών και επιστημόνων υγείας και αφορούν όλα τα στάδια της ΧΝΝ καθώς και των σχετιζόμενων με αυτή την επιπλοκών, από τη διάγνωση έως την παρακολούθηση και γενικότερα τη διαχείριση των ασθενών.

<sup>2</sup> Το Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO®) είναι ένας διεθνής μη κερδοσκοπικός οργανισμός υπό την αιγίδα του NFK, που σκοπό έχει τη βελτίωση της πορείας των ασθενών με ΧΝΝ και των πρακτικών φροντίδας τους, μέσω συντονισμού και προώθησης της συνεργασίας και σύμπνοιας αναφορικά με την ανάπτυξη και εφαρμογή των επίσημων οδηγιών.

Πίνακας 1. β: Στάδια Χρόνιας Νεφρικής Νόσου, (Ανατύπωση από Levey, 2002)

Στάδιο	Περιγραφή	GFR(mL/min/1.73m <sup>2</sup> )
1	Νεφρική βλάβη με φυσιολογικό ή αυξημένο GFR	≥ 90
2	Νεφρική βλάβη με ήπια μείωση του GFR	60-89
3	Μέτρια μείωση του GFR	30-59
4	Με σοβαρή μείωση του GFR	15-29
5	Νεφρική ανεπάρκεια	<15 (ή εξωνεφρική κάθαρση)

### 1.2.1 Αιτιολογία χρόνιας νεφρικής νόσου

Η μη αναστρέψιμη βλάβη των νεφρών ή και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας που συνιστούν τη ΧΝΝ, μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε πρωτοπαθών νοσογόνων καταστάσεων, που επηρεάζουν το νεφρικό-ουροποιητικό σύστημα αυτό καθ' εαυτό, είτε δευτεροπαθούς αιτιολογίας, που αποτελούν και τα συχνότερα αίτια εμφάνισης ΧΝΝ ( Πίνακας 2).

Πιο συγκεκριμένα, ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) στον οποίο αποδίδεται το 40% της αιτιολογίας της νόσου, στο πλαίσιο των μικροαγγειακών του επιπλοκών προκαλεί βλάβες στους νεφρούς, μέσω μηχανισμών που απορρέουν από την προκαλούμενη υπεργλυκαιμία (συσσώρευση προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, απώλεια ενδοσπειραματικής ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης). Παρομοίως, η συστηματική αρτηριακή υπέρταση -η 2η συχνότερη αιτία της ΧΝΝ, που μαζί με το ΣΔ ευθύνονται σχεδόν για τα 2/3 των περιπτώσεων ΧΝΝ- προκαλεί βλάβες στα αγγεία των νεφρώνων. Οι βλάβες αυτές επιτείνουν το πρόβλημα της αρτηριακής υπέρτασης (φαύλος κύκλος) και οδηγούν σε υπερδιήθηση και τελικά προσβολή των νεφρικών σωληναρίων και εκδηλώνονται με αποβολή πρωτεϊνών από τα ούρα. Στις παθήσεις που επηρεάζουν δευτερογενώς τους νεφρούς



συγκαταλέγονται επίσης και αυτοάνοσες νόσοι, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ).

**Πίνακας 2:** Αίτια Χρόνιας Νεφρικής Νόσου, (Ανατύπωση από McPhee S et al. 2000)

<b>Αίτια Χρόνιας Νεφρικής Νόσου</b>
Σακχαρώδης διαβήτης
Αρτηριακή υπέρταση
Σπειραματονεφρίτιδες
Κληρονομούμενες νεφροπάθειες (πολυκυστικοί νεφροί)
Απόφραξη ουροφόρων οδών (νεφρολιθίαση, καρκίνος)
Συγγενείς παθήσεις (παλινδρόμηση ούρων)
Φάρμακα & τοξίνες
Αυτοάνοσα νοσήματα (ΣΕΛ)

Στα νοσήματα που εντοπίζονται πρωτίστως στους νεφρούς ξεχωρίζουν οι σπειραματονεφρίτιδες, όπου η προκαλούμενη φλεγμονή του σπειράματος οδηγεί συνήθως σε μία προοδευτική καταστροφή του και οι πολυκυστικοί νεφροί, η πιο συχνή κληρονομούμενη νεφρική νόσος στην οποία οι δημιουργούμενες κύστες καταστρέφουν τον παρακείμενο ιστό. Άλλες σπανιότερες κληρονομούμενες διαταραχές που μπορούν να οδηγήσουν σε μόνιμη βλάβη των νεφρών είναι το σύνδρομο Alport (κληρονομούμενη νεφρίτιδα), η πρωτοπαθής υπεροξαλουρία και η κυστινουρία. Η ΧΝΝ μπορεί επίσης να εμφανιστεί ως αποτέλεσμα απόφραξης των ουροφόρων οδών, όπως συμβαίνει στη νεφρολιθίαση και επί παρουσία καρκινικών όγκων, όπου εμπόδια στη φυσική ροή των ούρων ασκούν μία αντίστροφη ροή της πίεσης στο νεφρό βλάπτοντας τελικά τους νεφρώνες.

Άλλα σπανιότερα αίτια της ΧΝΝ είναι οι επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, κυρίως των ουροφόρων οδών, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των συγγενών

παθήσεων του ουροποιητικού συστήματος, με κύριο εκπρόσωπο την παλινδρόμηση των ούρων, κατά την οποία οι συχνές λοιμώξεις μπορούν να οδηγήσουν σε σταδιακή ουλοποίηση του νεφρικού παρεγχύματος και τελικά σε ΧΝΝ. Τέλος, φαρμακευτικές ουσίες όπως κάποια παυσίπονα, τοξίνες και ναρκωτικές ουσίες (ηρωίνη, κρακ) μπορούν επίσης να προκαλέσουν μη αναστρέψιμη νεφρική βλάβη (<http://www.kidney.org>).

### **1.2.2. Διάγνωση– Αντιμετώπιση**

Αν και έχουν γίνει αξιόλογα βήματα για την πρόιμη διάγνωση και αντιμετώπιση της ΧΝΝ με την εισαγωγή των κατευθυντήριων συστάσεων κλινικής πρακτικής, παραμένει σε μεγάλο βαθμό μία "σιωπηλή" νόσος στα αρχικά στάδιά της. Η καθυστερημένη διάγνωση και ο σημαντικός αριθμός των ήδη απολεσθέντων νεφρώνων έχει ως αποτέλεσμα να πυροδοτεί ένα φαύλο κύκλο και τελικά μία ταχεία πτώση του GFR. Αυτό, σε συνδυασμό με τη σταδιακή γήρανση του πληθυσμού, τις επιδημικές διαστάσεις παραγόντων κινδύνου για εμφάνιση ΧΝΝ, όπως ο ΣΔ και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, αλλά και παραγόντων εξέλιξης της απώλειας της νεφρικής λειτουργίας, όπως η υπέρταση και η παχυσαρκία, έχουν οδηγήσει σε σημαντική αύξηση του επιπολασμού των τελευταίων σταδίων της ΧΝΝ. Προς την κατεύθυνση αυτή φαίνεται να συνεισφέρουν και η μειωμένη καρδιαγγειακή θνησιμότητα των νεφροπαθών που τους επιτρέπει να ζουν αρκετά ώστε να φτάνουν στα τελικά αυτά στάδια, καθώς και η βελτιωμένη διαθεσιμότητα και ποιότητα των μεθόδων υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας. Όταν, η νεφρική λειτουργία μειωθεί στο 10-15% της φυσιολογικής τότε οι συντηρητικές μέθοδοι αντιμετώπισης ανεπαρκούν να ελέγξουν τα προβλήματα που δημιουργούνται και είναι απαραίτητη η έναρξη εξωνεφρικής κάθαρσης (αιμοκάθαρσης ή περιτοναϊκής κάθαρσης), ή η υποβολή σε μεταμόσχευση νεφρού (<http://www.kidney.org>, <http://www.ene.gr/>).

### 1.3 Η μεταμόσχευση νεφρού

Η μεταμόσχευση αποτελεί την καλύτερη και σε κάποιες περιπτώσεις τη μοναδική εναλλακτική θεραπεία για ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Τα προς μεταμόσχευση όργανα μπορεί να προέρχονται από ζώντες ή πτωματικούς δότες. Ωστόσο, η διαδικασία της μεταμόσχευσης σχετίζεται με πολλά ηθικά διλήμματα και αντιπαραθέσεις, που αφορούν είτε τους ζώντες είτε τους πτωματικούς δότες. Όσον αφορά στους ζώντες δότες, η αυθόρμητη και αδέσμευτη (αλτρουιστική) δωρεά οργάνου προς μεταμόσχευση, κυρίως από συγγενείς, υπολείπεται των αναγκών για μοσχεύματα. Η χρήση μοσχευμάτων που προέρχονται από ζώντες, μη συγγενείς δότες, πρέπει να είναι ηθικά και νομικά δικαιολογημένη, για να είναι δυνατή η προστασία των ζώντων δωτών. Όσον αφορά στους πτωματικούς δότες, μείζον θέμα αποτελεί ο ορισμός του εγκεφαλικού θανάτου. Έτσι λοιπόν, είναι απαραίτητη η ύπαρξη κατευθυντήριων οδηγιών για τις μεταμοσχεύσεις. Το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Μεταμοσχεύσεων έχει θεσπίσει κάποιους κανόνες για να εξασφαλίσει κατά το δυνατόν την ηθική στο χώρο των μεταμοσχεύσεων και είναι απαραίτητο όλοι οι ειδικοί που εμπλέκονται στις μεταμοσχεύσεις να είναι συνεπείς σε αυτές τις κατευθυντήριες οδηγίες (<http://www.ene.gr/>).

Οι ζώντες δότες μοσχευμάτων μπορεί να διακριθούν σε πέντε κατηγορίες:

1. Ζώντες συγγενείς δότες
2. Ζώντες συγγενείς δότες μη συναισθηματικά συνδεδεμένοι με τον λήπτη
3. Ζώντες μη συγγενείς δότες με αλτρουϊστική δωρεά
4. Ζώντες μη συγγενείς δότες με ανταμειβόμενη δωρεά
5. Ζώντες μη συγγενείς δότες με καθαρά εμπορική συναλλαγή

Οι πτωματικοί δότες μοσχευμάτων μπορεί να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες:

1. Εγκεφαλικά νεκροί δότες (δότες με πάλλουσα καρδιά)
2. Δότες με καρδιοπνευμονική παύση (arrest)
3. Δότες με μη πάλλουσα καρδιά (non-heart-beating) (<http://www.ene.gr/>)

### 1.3.1 Διαδικασία επιλογής

Συμφώνα με τον Εθνικό Οργανισμό Μεταμοσχεύσεων (Ε.Ο.Μ.)<sup>3</sup> ο ασθενής με ΧΝΝ που υποβάλλεται σε αιμοκάθαρση, προκειμένου να εγγραφεί στο Εθνικό Μητρώο Υποψήφιων Ληπτών (λίστα αναμονής)<sup>4</sup>, για μεταμόσχευση από πτωματικό δότη, πρέπει να ολοκληρώσει συγκεκριμένο προμεταμοσχευτικό έλεγχο (Π.Ε.). Από τον έλεγχο αυτό θα κριθεί η καταλληλότητά του για μεταμόσχευση.

Το έντυπο του προμεταμοσχευτικού έλεγχου, στο οποίο αναφέρονται όλες οι προβλεπόμενες κλινικές, παρακλινικές και εργαστηριακές εξετάσεις, συμπεριλαμβανομένων της ομάδας αίματος, της τυποποίησης των ιστών (tissue typing) και των κυτταροτοξικών αντισωμάτων, υπάρχει σε όλες τις μονάδες τεχνητού νεφρού (Μ.Τ.Ν.), τόσο κρατικές όσο και ιδιωτικές, καθώς και στον ΕΟΜ. Το έντυπο αυτό συμπληρώνεται από το νεφρολόγο της Μονάδας Τεχνητού Νεφρού (Μ.Τ.Ν.), ο οποίος εγκρίνει και υπογράφει την καταλληλότητα του υποψήφιου λήπτη. Στη συνέχεια το έντυπο επικυρώνεται από τον υπεύθυνο νεφρολόγο και χειρουργό της Μονάδας Μεταμόσχευσης, στην οποία επιθυμεί να μεταμοσχευθεί ο ασθενής. Ακολούθως, ένα αντίγραφο του Π.Ε. κατατίθεται στον Εθνικό Οργανισμό Μεταμοσχεύσεων, ο οποίος έχει την αρμοδιότητα της τήρησης και της διαχείρισης του Εθνικού Μητρώου Υποψήφιων Ληπτών.

---

<sup>3</sup> Εθνικός Οργανισμός Μεταμοσχεύσεων: Ο Ε.Ο.Μ. αποτελεί Νομικό Πρόσωπο Ιδιωτικού Δικαίου με έδρα την Αθήνα, το οποίο τελεί υπό την εποπτεία του Υπουργείου Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης. Σκοπός του είναι η υποβοήθηση του Υπουργείου Υγείας και Πρόνοιας για τη χάραξη εθνικής πολιτικής της χώρας μας για την ανάπτυξη στον τομέα των μεταμοσχεύσεων.

<sup>4</sup> Λίστα αναμονής – Εθνικό Μητρώο υποψηφίων ληπτών: Η προτεραιότητα ληπτών μοσχεύματος (στοιχεία προτεραιότητας μεταξύ των υποψηφίων ληπτών μοσχεύματος) αφορά: α) τη συμβατότητα/ταυτοποίηση: αίματος (ABO, Rh) και αντιγόνων (HLA) β) το χαρακτήρα επείγοντος, γ) τη βαρύτητα της νόσου δ) το χρόνο αναμονής στον κατάλογο υποψηφίων ληπτών ε) την ηλικία στ) τη σωματική διάπλαση.

Τα κριτήρια κατανομής διατίθενται με μοριοποιημένο σύστημα βαθμολόγησης των υποψηφίων ληπτών, όπου πραγματοποιείται σε ηλεκτρονικό πρόγραμμα και κοινοποιείται από τον EOM προς τις μονάδες μεταμόσχευσης και τα εργαστήρια ιστοσυμβατότητας για την έναρξη της μεταμοσχευτικής διαδικασίας. Ειδικότερα, η μοριοδότηση γίνεται ως εξής:

Σύμφωνα με την ιστοσυμβατότητα<sup>5</sup> δότη-λήπτη. Έξι είναι τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τα οποία ελέγχονται: HLA A, HLA B, HLA DR (δύο στο καθένα). Για κάθε κοινό αντιγόνο δότη - λήπτη τα μόρια είναι 66,67. Για πλήρη ιστοσυμβατότητα (έξι στα έξι κοινά αντιγόνα) ο λήπτης παίρνει 400 μόρια και προηγείται όλων. Για παιδιά κάτω των 16 ετών γίνεται διπλασιασμός των μορίων που προκύπτουν από τον υπολογισμό της ιστοσυμβατότητας. Η ημερομηνία έναρξης αιμοκάθαρσης αποτελεί κριτήριο επιλογής του κατάλληλου λήπτη ο οποίος λαμβάνει 20 μόρια για κάθε χρόνο παραμονής του στην αιμοκάθαρση, καθώς και η ομάδα αίματος, ο επείγων χαρακτήρας της κλινικής κατάστασης του ασθενούς και ο υψηλός ή όχι τίτλος κυτταροτοξικών αντισωμάτων του.

Σύμφωνα με ιατρικές προτεραιότητες, οι ασθενείς που θα εγγραφούν στη λίστα επείγουσας μεταμόσχευσης παίρνουν το πρώτο διαθέσιμο μόσχευμα από δότη με συμβατή ομάδα αίματος και αρνητικό crossmatch (δοκιμασία διασταυρώσεις), ασχέτως ιστοσυμβατότητας. Προϋπόθεση για να εγγραφεί κάποιος ασθενής στην επείγουσα λίστα είναι να έχει εξαντληθεί η δυνατότητα οποιασδήποτε θεραπείας εξωνεφρικής κάθαρσης και πιο συγκεκριμένα όσον αφορά στην αιμοκάθαρση να υπάρχει αδυναμία οποιασδήποτε τοποθέτησης καθετήρα (αδύνατη αγγειακή προσπέλαση), καθώς και καταστροφή του περιτόναιου κάτι το οποίο αποκλείει την περιτοναϊκή κάθαρση. Επομένως πρέπει να υπάρχει απόλυτη αδυναμία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με μια από τις γνωστές μεθόδους. Τούτο διαπιστώνεται με αιτιολογημένη απόφαση του θεράποντος ιατρού και του υπεύθυνου χειρουργού της Μονάδας Μεταμόσχευσης (<http://eom.gr/>).

---

<sup>5</sup> Ιστοσυμβατότητα: σύστημα ιστοσυμβατότητας, θεωρούμε εξ ορισμού, πρωτεϊνικές ομάδες εντοπισμένες πάνω στις μεμβράνες των εμπύρηνων κυττάρων των θηλαστικών που καθορίζουν την αντιγονική τους έκφραση. Τα αντιγόνα αυτά (Human Leucocyte Antigen-HLA) κληρονομούνται με τη μορφή απλοτύπου από κάθε γονέα.

### 1.3.2. Ζώντες δότες

Οι ζώντες δότες είναι άτομα απόλυτα υγιή, ιστοσυμβατά με το λήπτη, που μπορούν να προσφέρουν είτε ένα όργανο από τα διπλά, όπως ο νεφρός, είτε ένα τμήμα μονήρους οργάνου, όπως λοβό ή τμήμα ήπατος, ουρά παγκρέατος, λοβό πνεύμονα ή ακόμη και άλλον ιστό, όπως μυελό των οστών. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με την παρούσα νομοθεσία (Ν. 3984/2011, ΦΕΚ 150Α/27-6-2011) η αφαίρεση οργάνων από ζώντα δότη επιτρέπεται μόνον όταν πρόκειται να γίνει μεταμόσχευση στις ακόλουθες περιπτώσεις: α) στο σύζυγό του, β) σε ασθενή με τον οποίο ο δότης συνδέεται με το σύμφωνο ελεύθερης συμβίωσης, σύμφωνα τα οριζόμενα στο ν. 3719/2008, γ) σε συγγενή μέχρι και τον τέταρτο βαθμό εξ αίματος, σε ευθεία ή πλάγια γραμμή, δ) σε συγγενή μέχρι το δεύτερο βαθμό εξ αγχιστείας, ε) σε πρόσωπο με το οποίο έχει προσωπική σχέση και συνδέεται συναισθηματικά. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται άδεια με δικαστική απόφαση, που εκδίδεται κατόπιν ελέγχου όλων των προϋποθέσεων αφαίρεσης οργάνου από ζώντα πρόσωπο και επιπλέον της ψυχικής υγείας του δονητικού δότη, της προσωπικής σχέσης και του συναισθηματικού δεσμού του με τον υποψήφιο λήπτη, όπως και της ανιδιοτέλειας της προσφοράς, αν ο σύζυγος ή συγγενής με τον ανωτέρω βαθμό συγγένειας ασθενούς, που χρήζει μεταμόσχευσης, επιθυμούν να κάνουν δωρεά του αναγκαίου οργάνου, αλλά δεν υπάρχει ιστοσυμβατότητα, πραγματοποιείται η αφαίρεση του οργάνου του δότη και ταυτόχρονα ο ασθενής προτάσσεται στην κατάταξη στο Εθνικό Μητρώο, ζ) εάν δεν υπάρχει ιστοσυμβατότητα μεταξύ δυο υποψήφιων ληπτών μοσχεύματος και του ζώντα συζύγου τους ή συγγενή τους με βαθμό συγγενείας ως άνω, αλλά υπάρχει ιστοσυμβατότητα μεταξύ ενός υποψήφιου λήπτη και του ζώντα συζύγου ή συγγενή του άλλου, επιτρέπεται η δωρεά οργάνων αμοιβαία, με απόφαση του Εθνικού Οργανισμού μεταμοσχεύσεων. Η αφαίρεση γίνεται μόνο από ενήλικο πρόσωπο.

### 1.3.3. Πτωματικοί δότες

Η έννοια «εγκεφαλικός θάνατος» αποτελεί το πιο δύσκολο κομμάτι όσον αφορά στην κατανόηση του και σε συνδυασμό με τον φυσικό θάνατο, ο οποίος συνήθως εννοείται ως η διακοπή της καρδιακής και αναπνευστικής λειτουργίας. Η πλειοψηφία των δοτών ανήκει στην κατηγορία του εγκεφαλικού θανάτου (West et al. 2002).

Οι πληροφορίες που χρειάζονται για την αποδοχή ή όχι των μοσχευμάτων<sup>6</sup> από τις μεταμοσχευτικές ομάδες περιλαμβάνουν: ηλικία, φύλο, βάρος, ύψος, αιτία εγκεφαλικού θανάτου, διάρκεια και ιστορικό νοσηλείας (εάν το ιστορικό αφορά σε τραύμα θα πρέπει να αναφέρεται εάν συμμετείχαν και ποιες άλλες περιοχές εκτός της κρανιοεγκεφαλικής κάκωσης), ημερομηνία διασωλήνωσης, χρόνος καρδιοαναπνευστικής αναζωογόνησης, αιμοδυναμική κατάσταση, είδος και δόση ινοτρόπων, ομάδα ABO και Rhesus. Με αυτές τις πληροφορίες οι περισσότερες μεταμοσχευτικές ομάδες μπορούν να εκτιμήσουν την ποιότητα του δότη και των αντίστοιχων οργάνων. Οι εργαστηριακές εξετάσεις και λοιπές πληροφορίες οφείλουν να συμπληρώνουν την εικόνα σχετικά με τον υποψήφιο δότη μέσα στις επόμενες λίγες ώρες για την οριστική αποδοχή ή απόρριψη της προσφοράς για κάθε όργανο χωριστά.

Η λήψη των οργάνων ρυθμίζεται από τον υπεύθυνο συντονιστή μεταμοσχεύσεων, πάντα στο νοσοκομείο του δότη και συνήθως τις βραδινές ώρες για να μην οδηγεί σε διαταραχή της ρουτίνας του νοσοκομείου προσφοράς ανατρέποντας προγραμματισμένες επεμβάσεις. Ο χρόνος έναρξης επίσης είναι

---

<sup>6</sup> Μόσχευμα: είναι ο ιστός ή το όργανο, το οποίο εμφυτεύεται στο λήπτη.

Μοσχεύματα (είδη): ανάλογα με τη γενετική σχέση μεταξύ του δότη και του λήπτη, διακρίνονται 3 είδη μοσχευμάτων

α) Αυτομοσχεύματα: αυτά προέρχονται από το ίδιο άτομο, π.χ. δερματικά μοσχεύματα, οστικά μοσχεύματα,

β) Αλλομοσχεύματα: όταν ο δότης και ο λήπτης του μοσχεύματος είναι γενετικά διαφορετικοί αλλά ανήκουν στο ίδιο ζωικό είδος, π.χ. μόσχευμα από άνθρωπο σε άνθρωπο,

γ) Ξενομοσχεύματα: όταν ο δότης και ο λήπτης είναι άτομα προερχόμενα από διαφορετικό ζωικό είδος, π.χ. μόσχευμα προερχόμενο από βαβουίνο σε άνθρωπο.

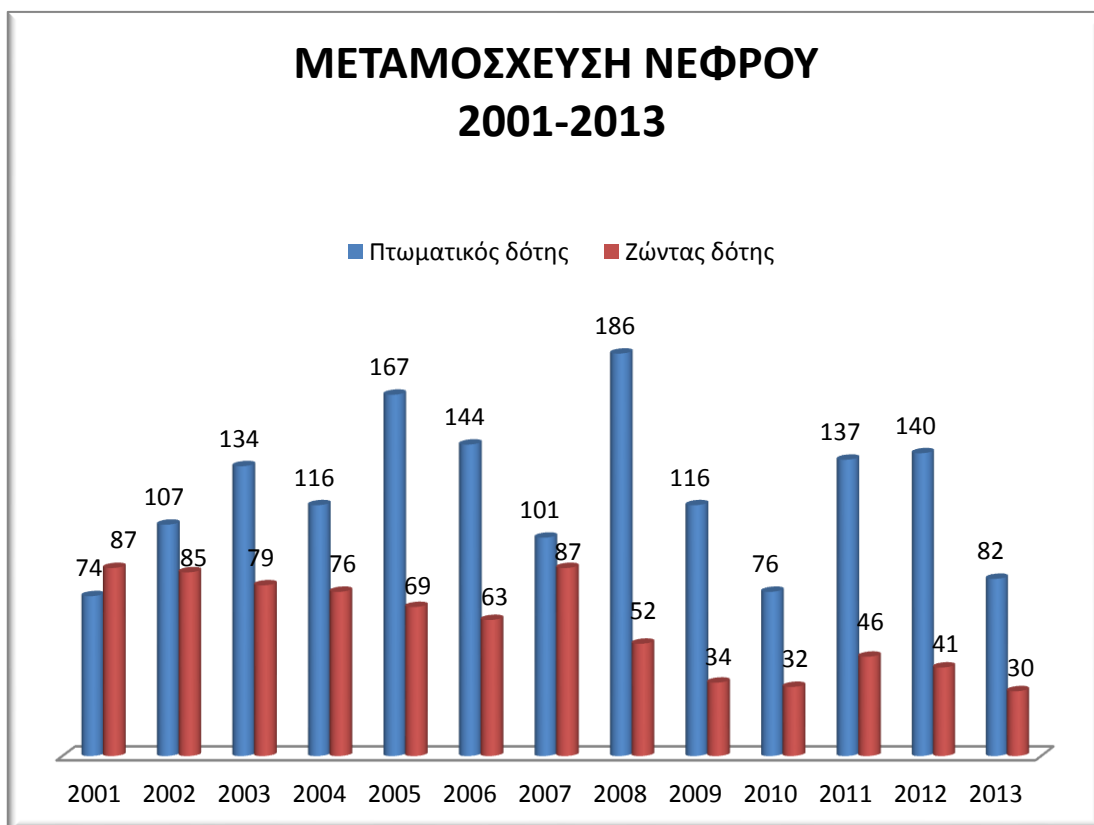
συγκεκριμένος και στο χειρουργείο συναντώνται οι διάφορες μεταμοσχευτικές ομάδες. Ο χειρουργός ή οι διάφορες χειρουργικές ομάδες που θα κάνουν τις λήψεις οφείλουν προτού ξεκινήσουν να ελέγξουν τα κάτωθι:

- 1) Παρουσία βεβαίωσης εγκεφαλικού θανάτου ως ο νόμος ορίζει.
- 2) Συγκατάθεση (έγγραφη και υπογεγραμμένη) για τη δωρεά, ως ο νόμος ορίζει.
- 3) Διάγραμμα νοσηλείας στη Μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) (αιμοδυναμική κατάσταση, ινότροπα, φάρμακα κ.λ.π.).
- 4) Ορολογικός έλεγχος για
  - Ηπατίτιδα Β (HBV)
  - Ηπατίτιδα C (HCV)
  - Ιός της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (HIV)
  - Κυτταρομεγαλοϊός (CMV)
- 5) Εργαστηριακές εξετάσεις (για κάθε όργανο, κάθε ομάδα).
- 6) Παρουσία ή στοιχεία ενδεικτικά σήψης (<http://www.transplantation.gr>).

#### **1.3.4. Η μεταμόσχευση στην Ελλάδα**

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Ε.Ο.Μ., στην Ελλάδα κυρίως από πτωματικούς δοτές (εικόνα 4), ένας από τους λόγους του φαινομένου αυτού είναι η έλλειψη της σωστής ενημέρωσης για την δωρεά οργάνων. Η ενημέρωση πρέπει να είναι πλήρης, εύκολα κατανοητή, αντικειμενική και να παρέχεται με διακριτικότητα και σεβασμό στην ελευθερία, την προσωπικότητα, τις θρησκευτικές, κοινωνικές και φιλοσοφικές πεποιθήσεις του ατόμου.





Εικόνα 4: Πτωματικός και Ζώντας Δότης, Ελλάδα, 2001-2013 (Ανατύπωση από Ε.Ο.Μ.)

Για να αντιμετωπιστούν οι εθνικές ανάγκες της Ελλάδας, πρέπει να πραγματοποιούνται κάθε χρόνο 300 μεταμοσχεύσεις νεφρού, από πτωματικούς δότες. Η προσφορά, όμως, είναι πολύ περιορισμένη, με αποτελεσματικά να γίνονται σε ετησία βάση περίπου 150 μεταμοσχεύσεις. Ως αποτέλεσμα αυτών, είναι να μεγαλώνει η λίστα αναμονής και σήμερα βρίσκονται καταγεγραμμένοι σε αυτή 890 Έλληνες, οι οποίοι αναμένουν να βρεθεί νεφρικό μόσχευμα. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση που παρατηρήθηκε το 2008, που πραγματοποιήθηκαν 186 μεταμοσχεύσεις νεφρού από πτωματικούς δότες (<http://eom.gr/>).

Παρολαυτά, δυστυχώς αυξάνεται το χάσμα ανάμεσα στη ζήτηση για μεταμοσχεύσεις και στην παροχή οργάνων και ιστών. Το ερώτημα που τίθεται είναι αν μπορεί να γεφυρωθεί το χάσμα. Εμφανώς θα πρέπει πρώτα να αυξηθεί η διαθεσιμότητα οργάνων προς μεταμόσχευση και ταυτόχρονα να μειωθεί η ζήτηση όντας περισσότερο επιλεκτικοί στην αποδοχή ασθενών για μεταμόσχευση. Ο κύριος όγκος των προσφερόμενων μοσχευμάτων προέρχεται από τους δυνητικούς δότες, οι

οποίοι δηλώνονται από τις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (Μ.Ε.Θ). Οι βασικοί λόγοι της έλλειψης μοσχευμάτων μπορούν να συνοψιστούν σε τρεις κατηγορίες:

1. Οι δυνητικοί δότες οργάνων δεν αναγνωρίζονται από το προσωπικό των μονάδων όπου νοσηλεύονται.
2. Το προσωπικό των Μ.Ε.Θ. πολλές φορές δεν ενημερώνει το οικογενειακό περιβάλλον για τη δυνατότητα δωρεάς οργάνων.
3. Οι συγγενείς του δυνητικού δότη δεν δίνουν την συγκατάθεση τους (Τακούδας, 2007).

### 1.3.5. Διατήρηση μοσχευμάτων

Είναι σαφές ότι η πρόοδος των μεταμοσχεύσεων συμπαγών οργάνων ιστορικά οφείλεται σε τρεις λόγους: i) Την ανάπτυξη των εγχειρητικών τεχνικών για την πραγματοποίησή τους. ii) Την ανάπτυξη της δυνατότητας για συντήρηση των μοσχευμάτων. iii) Την αντιμετώπιση της απόρριψης. Με τη σχεδόν καθολική χρήση του διαλύματος UW<sup>7</sup> οι χρόνοι ψυχρής ισχαιμίας έχουν σήμερα ως εξής:

- Καρδιά: 6 ώρες
- Πνεύμονες: 4 ώρες
- Ήπαρ: 24 ώρες
- Πάγκρεας: 12 ώρες
- Νεφροί: 60 ώρες

Οι στόχοι της συντήρησης είναι οι εξής δύο: Διατήρηση της λειτουργικότητας και πρόληψη της απόρριψης. Οι δύο παραπάνω στόχοι είναι στενά συνδεδεμένοι, αφού η επιμήκυνση του χρόνου ψυχρής ισχαιμίας επιτρέπει την ανεύρεση του

---

<sup>7</sup> Οι Belzer και Southard στο Πανεπιστήμιο του Wisconsin, το 1980 δημιούργησαν ένα διάλυμα γνωστό ως University of Wisconsin solution (UW), το οποίο χρησιμοποιείται για τη διατήρηση και την αποθήκευση των συμπαγών οργάνων στους 0 – 5 °C. Το διάλυμα UW περιέχει υψηλή συγκέντρωση καλίου, το οποίο διατηρεί φυσιολογική ηλεκτρολυτική συγκέντρωση, παράγοντες για την υποστήριξη του υποθερμικού κυτταρικού οιδήματος (γαλακτοβιονικό οξύ, ραφινόζη και υδροξυαιθυλικό κολλοειδές), φωσφορικό και άλλους παράγοντες (γλουταθιόνη, αλοπουρινόλη και μαγνήσιο).

καλύτερου, από πλευράς ιστοσυμβατότητας, λήπτη. Σήμερα η μακρά ψυχρή ισχαιμία είναι στην πράξη εφικτή μόνο για τους νεφρούς, για τα υπόλοιπα όργανα περιορίζεται σε ABO και Rhesus συμβατότητα. Η συντήρηση των μοσχευμάτων είναι ένα πεδίο στο οποίο αναμένονται σημαντικές εξελίξεις τα επόμενα χρόνια (Southard, 1995, Τακούδας, 2007).

## 2. Ανοσολογικός Έλεγχος στη Μεταμόσχευση Νεφρού

Τα νεφρικά μοσχεύματα μπορούν να εκφράζουν δύο τύπους άλλο-αντιγόνων: μείζονα (major) και ελάσσονα (minor). Η ιεραρχία αυτή προέκυψε από την ταχύτητα με την οποία απορρίπτονταν δερματικά μοσχεύματα σε πρωτοποριακές εργασίες, πολύ πριν ανακαλυφθεί η μοριακή δομή αυτών των άλλο-αντιγόνων.

Η ταυτότητα, μεταξύ λήπτη και δότη, ως προς τα αντιγόνα HLA, είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της μεταμόσχευσης, ιδίως σε HLA-A, HLA-B, HLA-DR γονιδιακές θέσεις

### 2.1. Μείζονα και Ελάσσονα Αντιγόνα Ιστοσυμβατότητας

#### 2.1.1. Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC)

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Complex Histocompatibility, MHC) είναι ένα σύνολο στενά συνδεδεμένων (γι' αυτό φέρεται ως *σύμπλεγμα*) και εξαιρετικά πολύμορφων γονιδίων, που απαντάται σε όλα τα είδη των σπονδυλωτών. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν την παραγωγή γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες εκφράζονται, με διαφορετική κατανομή, στην επιφάνεια όλων σχεδόν των εμπύρηνων κυττάρων και ονομάζονται *αντιγόνα HLA* (Human Leucocyte Antigens), αλλά και πλήθος άλλων πρωτεϊνών ποικίλης λειτουργικότητας (Choo, 2007).

Τα HLA μόρια δεν έχουν την ικανότητα διάκρισης μεταξύ πεπτιδίων προερχομένων από την αποδόμηση του «ίδιου» ή «ξένων» πρωτεϊνών. Ο βασικός βιολογικός ρόλος των HLA συνίσταται στο σχηματισμό συμπλέγματος με τα πεπτίδια των επεξεργασμένων πρωτεϊνικών αντιγόνων και στην παρουσίαση του στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Antigen Presenting Cell, APC). Από μελέτες που έγιναν, αποκαλύφθηκε ότι γονίδια της περιοχής HLA καθορίζουν την ικανότητα των T-λεμφοκυττάρων να απαντούν σε θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα. Κάθε άτομο διαφέρει στην ικανότητά του να απαντά κάτω από τον έλεγχο τέτοιων γονιδίων (Perrealt et al. 1990).

Τα HLA αντιγόνα τάξης I εμφανίζονται στην 6<sup>η</sup> εμβρυϊκή εβδομάδα και βρίσκονται σε όλα τα εμπύρνα κύτταρα ενώ τα της τάξης II την 20<sup>η</sup> -32<sup>η</sup> εβδομάδα, ανευρίσκονται σε ορισμένες ομάδες κυττάρων όπως στα B λεμφοκύτταρα, T-διεγερμένα λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα. Παραμένουν αμετάβλητα σε όλη τη διάρκεια της ζωής. Υπάρχουν τόσο ποιοτικές, όσο και ποσοτικές διαφορές στην κατανομή τους (Bodmer, 1987).

Το HLA σύστημα είναι εξαιρετικά πολύμορφο, υπάρχουν δηλαδή πολλές γονιδιακές μορφές (αλληλία) για κάθε τόπο (locus). Οι HLA-B και HLA-DRB1 γονιδιακές θέσεις είναι οι περισσότερο πολυμορφικές (555 και 432 αλληλία αντίστοιχα). Ο πολυμορφισμός των HLA τάξης I μορίων εντοπίζεται στο 2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> εξόνιο, τα οποία κωδικοποιούν τα α1 και α2 πεδία που συγκροτούν τη σχισμοειδή θήκη των HLA I μορίων. Ειδικότερα όμως για τα HLA-B μόρια αναφέρονται σημαντικοί πολυμορφισμοί και στο 1<sup>ο</sup> και το 4<sup>ο</sup> εξόνιο. Από την άλλη μεριά, ο πολυμορφισμός των HLA τάξης II μορίων εντοπίζεται στο 2<sup>ο</sup> εξόνιο. Εντούτοις έχουν αναφερθεί πολυμορφισμοί και σε άλλα εξόνια (κυρίως για τα DQA1 μόρια) ή και σε ιντρόνια (Alves, 2006).

### 2.1.2. Γενετική του συστήματος HLA

Το MHC καταλαμβάνει τμήμα περίπου τεσσάρων centimorgans στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 και αντιπροσωπεύει το 1% της όλης γενετικής πληροφορίας του ανθρώπου. Το Σύστημα Ιστοσυμβατότητας ή σύστημα HLA (Human Leucocyte Antigens, όπως ήταν η αρχική ονομασία του συστήματος), αποτελείται από τρία μεγάλα συμπλέγματα (clusters) γονιδίων, τα τάξης I, II και III, τα οποία αντιστοιχούν σε γονιδιακές θέσεις. Η κάθε γονιδιακή θέση εκφράζεται στο χρωμόσωμα με πολλές γονιδιακές μορφές ή αλληλόμορφα, ενώ στην επιφάνεια του κυττάρου εκφράζεται με μία μορφή, δηλαδή το αντίστοιχο HLA αντιγόνο.

Οι σειρές των αλληλομόρφων των γονιδίων για τα τάξης I κωδικοποιούνται από τις γονιδιακές θέσεις HLA-A, B, C, για τα τάξης II από τις HLA-D, DR, DP, DQ και για τα τάξης III από τις C2, BF, C4A, C4B (Εικόνα 5). Άλλα γονίδια της περιοχής HLA είναι τα GLO (γλυοξαλάση των ερυθροκυττάρων), η 21-υδροξυλάση (κυτταρόχρωμα των επινεφριδίων υπεύθυνο για την 21-υδροξυλίωση

των κορτικοειδών), καθώς και τα γονίδια  $\alpha$  και  $\beta$  για τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF). Δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί εάν τα «αλλότρια» αυτά γονίδια περιλαμβάνονται τυχαία και αντιπροσωπεύουν αλληλουχίες από τα αρχικά στάδια της εξέλιξης ή έχουν κάποιον ιδιαίτερα σπουδαίο βιολογικό ρόλο (Bodmer, 1987 , Choo, 2007, Mahdi 2013 ).

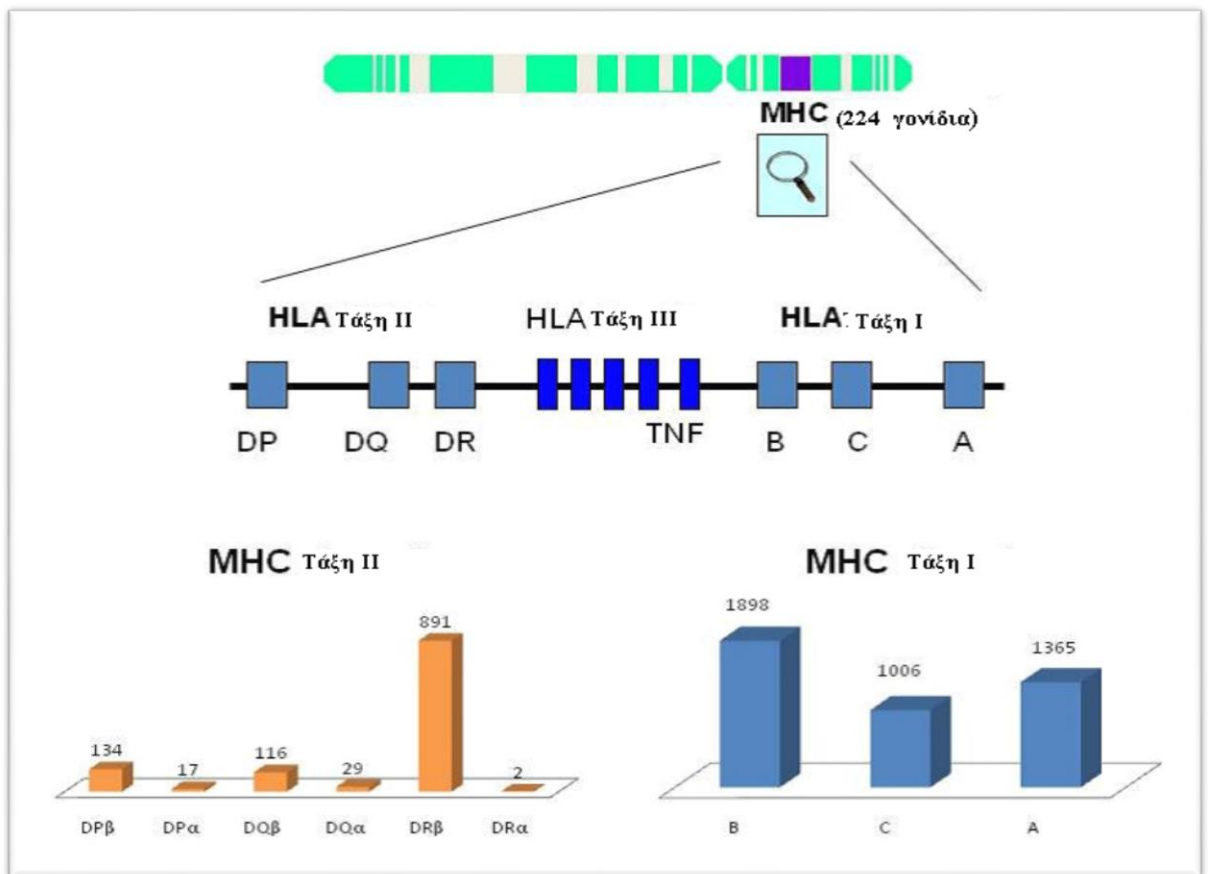
- Η τάξης I γονιδιακή θέση (region) περιλαμβάνει τρεις γενετικούς τόπους HLA-A, B, C, που κωδικοποιούν για τη βαρεία αλυσίδα των τάξης I μορίων. Με τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας, έχουν πρόσφατα διαπιστωθεί νέα γονίδια τάξης I τα HLA-E, HLA-F, HLA-G και HLA-H, των οποίων ο βιολογικός ρόλος δεν είναι ακόμη γνωστός. Το HLA-G γονίδιο που εκφράζεται στην τροφοβλάστη ενδεχομένως συνδέεται με τη διατήρηση του εμβρύου, μια και θεωρείται κατά το ήμισυ αλλομόσχευμα . Τα τάξης I μόρια εμφανίζονται σε όλα τα εμπύρνηνα σωματικά κύτταρα και κυρίως στα λεμφοκύτταρα. Οι κυτοκίνες αυξάνουν την έκφραση των τάξης I μορίων, ενώ η μεταμόρφωση των επιθηλιακών κυττάρων από ιούς οδηγεί σε ελαττωμένα επίπεδα εκφρασής τους. Στην περίπτωση της τάξης I μορίων η αυξημένη έκφραση συνοδεύεται από αύξηση της ποσότητας του mRNA. Τελικά, αυξημένη έκφραση των HLA μορίων αυξάνει πιθανώς την τύχη των αντιγονικών πεπτιδίων να αναγνωριστούν και να θανατωθούν από τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα.
- Η τάξης II γονιδιακή θέση περιλαμβάνει τις  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες των DR και DQ γονιδίων. Στην ίδια γονιδιακή θέση περιλαμβάνονται και άλλα γονίδια, των οποίων ο βιολογικός ρόλος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Πλησίον της περιοχής DP εδράζεται άθροισμα γονιδίων, όπως RING1, RING2, TAP I, TAP II, DMB, DOB κ.λπ., που παίζουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του αντιγόνου. Τα τάξης II μόρια εμφανίζονται στις κυτταρικές επιφάνειες των B λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων, μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα έχουν την κοινή ιδιότητα της “διαχείρισης” του αντιγόνου που προέρχεται από το εξωτερικό του κυττάρου και την έναρξη της ανοσιακής απάντησης, παρουσιάζοντας το στα T-λεμφοκύτταρα. Για το λόγο αυτό ορίζονται ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs). Τα DR μόρια βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες απ’ ότι τα DQ και DP, ωστόσο

κυτταρικές σειρές προερχόμενες από λεμφώματα και λευχαιμικά άτομα έδειξαν έκφραση των DP και DQ με ταυτόχρονη απουσία των DR μορίων.

- Η τάξης III περιοχή ανευρίσκεται μεταξύ των δύο προηγούμενων και περιλαμβάνει τους τόπους των διαλυτών πρωτεϊνών του συμπληρώματος C2, BF, C4A και C4B. Έχουν διαπιστωθεί μέχρι σήμερα περισσότερα από 36 γονίδια, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ειδική ανοσιακή απάντηση (Bodmer, 1987, Mahdi, 2013).

Η γ-ιντερφερόνη (INF-γ) προκαλεί την έκφραση των τάξης II μορίων, ενώ και ο TNFα δρα συνεργικά με την INF-γ. Ωστόσο, η αυξημένη έκφραση φαίνεται να κινητοποιεί τα κύτταρα, που παρουσιάζουν ένα αντιγονικό πεπτίδιο στα T βοηθητικά κύτταρα με αποτέλεσμα την αύξηση του επιπέδου της ανοσιακής απάντησης προς το ξένο αντιγόνο γενικότερα, αλλά και της απάντησης του ενεχόμενου κυττάρου.

Ο βασικός βιολογικός ρόλος των αντιγόνων HLA συνίσταται στον σχηματισμό συμπλέγματος με τα πεπτίδια των επεξεργασμένων πρωτεϊνικών αντιγόνων και στην παρουσία τους, στην επιφάνεια των APCs. Ο υποδοχέας των T-κυττάρων αναγνωρίζει το αντιγονικό πεπτίδιο μόνον, όταν αυτό παρουσιάζεται ως σύμπλεγμα με το HLA αντιγόνο και επάγει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα CD8+κυτταρολυτικά T-κυτταρα αναγνωρίζουν τα ξένα αντιγόνα μόνον όταν, παρουσιάζονται στην επιφάνεια των APCs συνδεδεμένα με τάξης I HLA μόρια, ενώ τα CD4+Βοηθητικά T-κυτταρα αναγνωρίζουν μόνον αντιγόνα συνδεδεμένα με τάξης II HLA μόρια (Laperrousaz, 2012, Mahdi, 2013).



Εικόνα 5: Γονιδιακός χάρτης της περιοχής MHC, (Ανατύπωση από Laperrousaz et al, 2012)

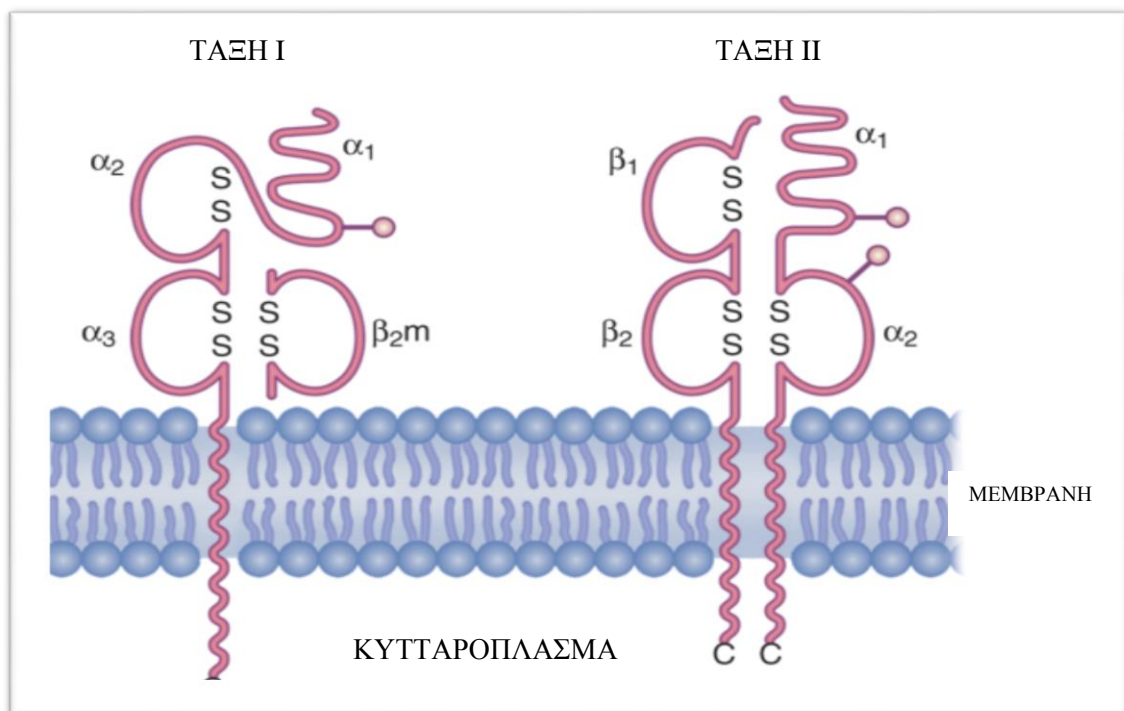
### 2.1.3. Δομή των HLA γονιδίων και μορίων

Οι βασικές μονάδες των HLA τάξης I μορίων αποτελούνται από μια βαριά πολυπεπτιδική αλυσίδα (α αλυσίδα) 340 αμινοξέων και από μια ελαφριά αλυσίδα, τη β2-μικροσφαιρίνη (β2-m) που κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 15 (Εικόνα 6). Η β2-μικροσφαιρίνη συνδέεται με το εξωτερικό κομμάτι της βαριάς αλυσίδας και χωρίς τη σύνδεση αυτή το λειτουργικό τάξης I μόριο δεν εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια (Choo, 2007). Τα τάξης I μόρια μοιράζονται την κοινή εξελικτικά καταγωγή τους με τις ανοσοσφαιρίνες και θεωρούνται μέλη της μεγάλης οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, η οποία περιλαμβάνει ακόμη τον T-κυτταρικό υποδοχέα και τα CD4 και CD8 μόρια προσκόλλησης (Bjorkman and Parham, 1990).

Κάθε HLA τάξης I μόριο έχει τη δική του ειδικότητα για σύνδεση με αντιγονικά πεπτίδια. Εντούτοις η σύνδεση δεν είναι τόσο ειδική όσο αυτή των αντιγόνων από τα αντισώματα, με αποτέλεσμα κάθε μόριο HLA τάξης I να μπορεί



να συνδεθεί με αρκετά μεγάλο φάσμα πεπτιδίων. Έτσι, ο περιορισμένος αριθμός των διαφόρων HLA τάξης I μορίων που εκφράζονται από κάθε άτομο να το καθιστά ικανό να απαντήσει στα περισσότερα αντιγόνα που του παρουσιάζονται από τα μόρια αυτά. Το γονίδια τάξης I περιλαμβάνει 8 εξόνια μήκους 3.5kb που διακόπτονται από 7 ιντρόνια ποικίλου μήκους. Η HLA τάξης I χρωμοσωμική περιοχή περικλείει ένα τμήμα DNA περίπου 1600kb τελομερικά του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 6. Υπάρχουν τρία γενικώς αναγνωρισμένα HLA τάξης I γονίδια στην παραπάνω περιοχή, τα HLA A, -B, -C που κωδικοποιούν τα ορολογικώς ανιχνευόμενα HLA τάξης I αντιγόνα, γνωστά και ως αντιγόνα μεταμόσχευσης και επιπλέον τρία ακόμη τάξης I γονίδια, τα HLA E, -F, -G, που επίσης κωδικοποιούν λειτουργικά μόρια, γνωστά ως μη κλασσικά τάξης I μόρια (nonclassical class I), Επίσης παρουσιάζει εντυπωσιακό πολυμορφισμό, με αποτέλεσμα να υπάρχουν: 139 HLA-A, 288 HLA-B και 87 HLA-C αλληλόμορφα (Mehra K, 2001).



Εικόνα 6: Δομή HLA I & II αντιγόνου ( Ανατύπωση από <http://www.uptomed.ir/Digimed.ir/cecil/Cecil/HTML/188.htm>)

Τα τάξης II HLA μόρια αποτελούνται από δύο α και β αλυσίδες 230 περίπου αμινοξέων. Κάθε αλυσίδα των τάξης II HLA μορίων έχει δυο εξωτερικές περιοχές των 90-100 αμινοξέων, την α1 και α2 για την α αλυσίδα και τη β1 και β2 για τη β αλυσίδα (εικόνα 5). Το εξωκυττάριο κομμάτι, των α και β αλυσίδων ακολουθεί ένα υδρόφιλο συνδετικό πεπτίδιο 10-12 αμινοξέων, ένα διαμεμβρανικό κομμάτι των 23 και 19 αμινοξέων για την α και β αλυσίδα αντίστοιχα και ένα υδρόφιλο ενδοκυττάριο τμήμα 8-15 αμινοξέων.

Στα HLA τάξης II μόρια ο πολυμορφισμός συγκεντρώνεται στις περιοχές μακριά από την κυτταρική μεμβράνη, στην α1 για τα DQ και DP εκτός των DR και στην β1 για τα DR, DQ και DP. Τα HLA-DQ και -DP μόρια εμφανίζουν πολυμορφισμό και στις δύο α και β αλυσίδες τους. Οι μοριακές τεχνικές αναγνωρίζουν τον πολυμορφισμό τόσο των HLA-DQβ και HLA-DPβ όσο και των HLA-DQα και HLA-DPα αλυσίδων. Ο πολυμορφισμός παίζει ρόλο στη διαμόρφωση της θέσης σύνδεσης, στο αντιγονικό πεπτίδιο, άρα καθορίζει την ειδικότητα της σύνδεσης (πίνακας 3) (Choo, 2007, Garcia et al. 2012).

Η κοντινότερη προς το κεντρομέρος του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 6 HLA τάξης II περιοχή (HLA-D περιοχή) εκτείνεται σε 900kb και περιέχει τρεις υποπεριοχές: HLA-DP, HLA-DQ και HLA-DR. Ξεκινώντας από το κεντρομέρος, η HLA-DP υποπεριοχή περιλαμβάνει δυο A (DPA1, DPA2) και δυο B (DPB1, DPB2) γονίδια. Η HLA-DQ περιοχή δύο A (DQA1, DQA2) και τρία B γονίδια (DQB1, DQB2, DQB3). Η HLA-DR υποπεριοχή περιέχει ένα μόνο A (HLA-DRA) γονίδιο για την κωδικοποίηση της α αλυσίδας, πέντε B (HLA-DRB1-5) για τη β αλυσίδα και τέσσερα ψευδογονίδια (HLA-DRB6-9). Ανάλογα με τον απλότυπο ένα DRA και ένα ή το πολύ δύο DRB γονίδια εκφράζονται. Επιπρόσθετα, δύο σειρές γονιδίων υπεύθυνες για τα αντιγονικά πεπτίδια των τάξης I μορίων χαρτογραφήθηκαν στην HLA II περιοχή.

Οι διάφορες δομικές περιοχές των α και β αλυσίδων των HLA τάξης II κωδικοποιούνται από ξεχωριστά εξόνια πάνω στα αντίστοιχα A και B γονίδια. Έτσι, το εξόνιο 1 των A και B γονιδίων κωδικοποιεί την 5'-αμετάφραστη περιοχή, το πεπτίδιο σήμα και 2-4 αμινοξέα της πρώτης περιοχής (α1 ή β1). Τα εξόνια 2 και 3 κωδικοποιούν το υπόλοιπο της α1 και β1 περιοχής και την εξωκυττάρια περιοχή κάθε αλυσίδας (α2 ή β2). Για την α αλυσίδα, το συνδετικό πεπτίδιο, η

διαμεμβρανική και η ενδοκυτοπλασματική περιοχή και ένα κομμάτι της 3'-αμετάφραστης περιοχής κωδικοποιούνται από το εξόνιο 4 του A γονιδίου. Το εξόνιο 5 του ίδιου γονιδίου κωδικοποιεί το υπόλοιπο της 3'-αμετάφραστης περιοχής. Το εξόνιο 5 κωδικοποιεί άλλο ένα κομμάτι της ενδοκυτοπλασματικής περιοχής και τέλος ότι απέμεινε από την περιοχή αυτή μαζί με ολόκληρη την 3'-αμετάφραστη περιοχή κωδικοποιείται από το εξόνιο 6 (Garcia et al. 20012).

Πίνακας 3: Κατάλογος των HLA-αντιγόνων. Ο χαρακτηρισμός w (από το workshop) μετά το γράμμα, που δηλώνει την περιοχή, σημαίνει ότι το συγκεκριμένο αντιγόνο δεν έχει ακόμη αναγνωρισθεί επίσημα, (Ανατύπωση από Garcia et al. 2012)

A/A	ΤΑΞΗ 1			ΤΑΞΗ 2		
ΘΕΣΕΙΣ	A	B	C	DR	DQ	DP
<b>ΑΛΛΗΛΙΑ</b>	A1	B5	B50 (21)	Cw1	DR1	DQ1 DPw1
	A2	B7	B51 (5)	Cw2	DR103	DQ2 DPw2
	A203	B703	B5102	Cw3	DR2	DQ3 DPw3
	A210	B8	B5103	Cw4	DR3	DQ4 DPw4
	A3	B12	B52 (5)	Cw5	DR4	DQ5 (1) DPw5
	A9	B13	B53	Cw6	DR5	DQ6 (1) DPw6
	A10	B14	B54 (22)	Cw7	DR6	DQ7 (3)
	A11	B15	B55 (22)	Cw8	DR7	DQ8 (3)
	A19	B16	B56 (22)	Cw9 (w3)	DR8	DQ9 (3)
	A23 (9)	B17	B57 (17)	Cw10 (w3)	DR9	
	A24 (9)	B18	B58 (17)		DR10	
	A2403	B21	B59		DR11 (5)	
	A25 (10)	B22	B60 (40)		DR12 (5)	
	A26 (10)	B27	B61 (40)		DR13 (6)	
	A28	B2708	B62 (15)		DR14 (6)	
	A29 (19)	B35	B63 (15)		DR1403	
	A30 (19)	B37	B64 (14)		DR1404	
	A31 (19)	B38 (16)	B65 (14)		DR15 (2)	
	A32 (19)	B39 (16)	B67		DR16 (2)	
	A33 (19)	B3901	B70		DR17 (3)	
	A34 (10)	B3902	B71 (70)		DR18 (3)	
	A36	B40	B72 (70)		DR51	
	A43	B4005	B73		DR52	
	A66 (10)	B41	B75 (15)		DR53	
	A68 (28)	B42	B76 (15)			
	A69 (28)	B44(12)	B77 (15)			
	A74 (19)	B45 (12)	B78			
	A80	B46	B81			
			B47	B82		
			B48	Bw4		
			B49 (21)	Bw6		

#### 2.1.4. Ονοματολογία και κληρονομικότητα των HLA μορίων

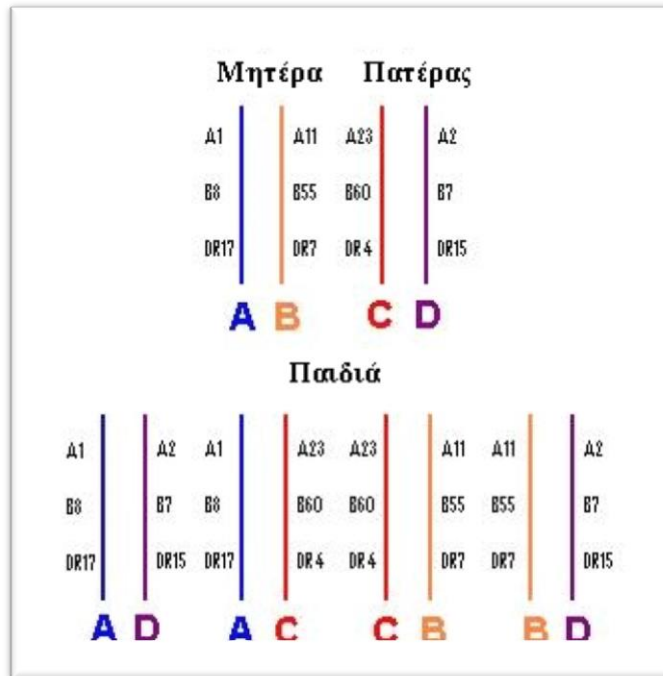
Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 24 αλληλία για την A, 51 για τη B και 8 για την C γονιδιακή θέση των HLA τάξης I μορίων, ενώ από τα HLA τάξης II μόρια έχουν αναγνωριστεί 259 αλληλία για την DR, 65 για την DQ και 107 για την DP γονιδιακή θέση. Καθώς περισσότερα HLA γονίδια έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί ως προς τις αλληλουχίες τους, οι παραπάνω αριθμοί έχουν αυξηθεί εντυπωσιακά. Έτσι 59 αλληλία χαρακτηρίστηκαν για την A γονιδιακή θέση, 118 για την B, 36 για την C, 124 για την DRB1, 4 DRB3, 5 DRB4, 5 DRB5, 3 DRB6, 2 DRB7, 2 DRA αλληλία, 25 DQB1, 16 DQA1, 62 DPB1 και 8 DPA1 αλληλία (Mahdi, 2013).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) για την HLA ονοματολογία, τα αλληλία κάθε γονιδιακής θέσης καθορίζονται από το γράμμα της γονιδιακής θέσης ακολουθούμενο από μια σειρά τεσσάρων αριθμών, αφού προηγηθεί αστερίσκος. Οι δύο πρώτοι αριθμοί υποδηλώνουν το αλληλίο, όπως το αναγνωρίζει η ορολογική τυποποίηση και οι δύο τελευταίοι καθορίζουν το αλληλίο από την αλληλουχία των αμινοξέων του (Choo, 2007).

Για τα HLA τάξης II αλληλία η ονοματολογία είναι παρόμοια, αλλά λαμβάνεται υπ' όψη ότι στις DR, DQ και DP υποπεριοχές περιέχονται περισσότερα από ένα B γονίδια ενώ στις DQ και DP υποπεριοχές υπάρχουν δύο A γονίδια. Στην αναγραφή, λοιπόν, του HLA τάξης II αλληλίου πριν τον αστερίσκο προηγείται ο αριθμός γονιδίου (Mahdi, 2013).

Όλες οι γονιδιακές θέσεις του MHC δεν είναι αυτόνομες, αλλά αποτελούν μία ενιαία λειτουργική μονάδα. Η μονάδα αυτή λέγεται απλότυπος. Ανασυνδυασμός των απλοτυπων παρατηρείται πολύ σπάνια, συνηθέστερα στις γυναίκες, με αποτέλεσμα να προκύπτουν νέοι απλότυποι. Κάθε άνθρωπος κληρονομεί ένα χρωμόσωμα από κάθε γονέα, γι' αυτό και τα σωματικά του κύτταρα έχουν δύο HLA απλότυπους. Το σύνολο των HLA αντιγόνων ενός ατόμου αποτελεί τον HLA φαινότυπο του. Το σύνολο των HLA γονιδίων που κληρονομούνται από τους δύο γονείς χαρακτηρίζει τον γονότυπο του ατόμου. Από τους δύο απλότυπους των γονέων, ένας μεταβιβάζεται σε κάθε παιδί και, κατά συνέπεια, από τα παιδιά ενός ζεύγους, το 25% θα είναι ταυτόσημα ως προς τους δύο απλότυπους, το 50% θα είναι

ταυτόσημα ως προς τον έναν απλότυπο και το 25% δεν θα έχουν κανένα κοινό απλότυπο (Εικόνα 7) (Laperrousaz et al. 2012, Mahdi, 2013).



Εικόνα 7: Το σύνολο των HLA γονιδίων που κληρονομούνται από τους στα παιδιά τους (Ανατύπωση από [http://www.inbc2.org/medical\\_services/transplant\\_services/hla\\_laboratory/histo\\_101.html](http://www.inbc2.org/medical_services/transplant_services/hla_laboratory/histo_101.html))

### 2.1.5. Ελάσσονα Συστήματα Ιστοσυμβατότητας

Η κυριότερη αιτία απόρριψης μοσχευμάτων είναι η κυτταρομεσολαβητική απόκριση των T-κυττάρων σε κύτταρο-επιφανειακά αντιγόνα. Τα αντιγόνα που επάγουν ανοσοαπόκριση σε άλλα άτομα καλούνται αντιγόνα ιστοσυμβατότητας και τα γονίδια που κωδικοποιούν την ειδική δομή και τη σύνθεσή τους καλούνται γονίδια ιστοσυμβατότητας (γονίδια H). Τα γονίδια αυτά κληρονομούνται σύμφωνα με τους απλούς νόμους του Mendel. Οι άνθρωποι θα είναι σχεδόν πάντοτε ετεροζυγώτες για τις γονιδιακές θέσεις MHC, αφού δεν ανήκουν σε αιμομικτικές σειρές. Όλα τα μοσχεύματα μεταξύ γονέων, από τον κάθε γονιό στα παιδιά ή από τα παιδιά στους γονείς θα περιλαμβάνουν τουλάχιστον μία MHC ασυμβατότητα. Μοσχεύματα από αδέρφια έχουν πιθανότητα 25% να έχουν MHC συμβατότητα. Στον άνθρωπο βρέθηκε ότι περίπου 50% των μοσχευμάτων νεφρών μεταξύ HLA συμβατών αδελφών, απορρίπτονται μετά από 5 χρόνια, γεγονός που δείχνει ότι στον

άνθρωπο ακόμα και μικρές διαφορές στις δευτερεύουσες γονιδιακές θέσεις, είναι αρκετές για την πρόκληση απόρριψης. Παρόλα αυτά, το κύριο εμπόδιο για επιτυχημένη μεταμόσχευση είναι το MHC αφού η απόρριψη από δευτερεύουσες διαφορές μπορεί να σταματήσει με κατάλληλη ανοσοκαταστολή με την προϋπόθεση φυσικά ότι ο δέκτης δεν έχει προηγουμένως ευαισθητοποιηθεί στα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (Bodmer, 1987)

Η μεταμόσχευση νεφρού μεταξύ HLA ταυτόσημων αδελφών, παρουσιάζει ένα ποσοστό απόρριψης 10% περίπου. Βασική αιτία της απόρριψης, μιας και υπάρχει πλήρης ταυτότητα μεταξύ δότη-λήπτη ως προς τα μείζονα συστήματα ιστοσυμβατότητας, είναι πιθανόν η ύπαρξη ελασσόνων συστημάτων ιστοσυμβατότητας (minor histocompatibility loci, mH), η μελέτη των οποίων απασχολεί τους ερευνητές επί μακρόν. Η ονοματολογία τους και η τοπογραφία τους, στο χρωμόσωμα, χρονολογούνται από την εποχή που ο G. Snell περιέγραψε τους δεκατρείς γενετικές θέσεις στο σύστημα ιστοσυμβατότητας H-2 του ποντικού.

Τελευταία, έχουν προσδιορισθεί περισσότερα από 50 (mH) γενετικές θέσεις στο χρωμόσωμα του ποντικού. Ακόμη και σήμερα, η γνώση για τα ελάσσονα συστήματα ιστοσυμβατότητας στον άνθρωπο, είναι πολύ περιορισμένη. Τελευταία δεδομένα συνηγορούν στην άποψη ότι είναι ενδογενή πεπτίδια ή υπεραντιγόνα, τα οποία σε συνεργασία με τα MHC μόρια παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης (Bueger, 1993).

## 2.2. Σύστημα ABO

### 2.1. ABO Συμβατότητα

Κυρίαρχα αντιγόνα του συστήματος ABO είναι το A και B, που εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς ανάλογα με την παρουσία ή απουσία τους, καθορίζουν την ομάδα αίματος.

Η συμβατότητα στα αντιγόνα των ομάδων αίματος, θεωρείται βασικός συντελεστής της επιτυχημένης μεταμόσχευσης οργάνων, καθώς η ασυμβατότητα δότη-λήπτη ως προς αυτά τα αντιγόνα καταλήγει σε απόρριψη σε διάστημα ωρών ή ημερών. Αυτή η οξεία απόρριψη οφείλεται σε προϋπάρχοντα φυσικά αντισώματα των A ή B αντιγόνων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία είναι παρόντα στο ενδοθήλιο (Schiffer and Kielstein, 2011).

- Ομάδα 0 σε ομάδα 0. Νεφροί από δότες με ομάδα 0 πρέπει να μεταμοσχεύονται σε λήπτες με ομάδα αίματος 0, εκτός αν υπάρχει λήπτης άλλης ομάδας με πλήρη ιστοσυμβατότητα HLA αντιγόνων (6 αντιγόνα ταυτόσημα).
- Ομάδα A σε ομάδα A. Εάν δεν υπάρχει κατάλληλος υποψήφιος με πλήρη συμβατότητα τότε αναζητείται υποψήφιος με πλήρη συμβατότητα από την ομάδα AB.
- Ομάδα B σε ομάδα B. Εάν δεν υπάρχει κατάλληλος υποψήφιος με πλήρη συμβατότητα τότε αναζητείται υποψήφιος με πλήρη συμβατότητα από την ομάδα AB.
- Ομάδα AB σε ομάδα AB (<http://www.kidney.org>).

Πίνακας 4: Επιλογή ομάδων αίματος του συστήματος ABO για συμβατότητα μεταμοσχεύσεις (Ανατύπωση από <http://www.kidney.org>)

Τύπος Αίματος ΛΗΠΤΗ	Τύπος Αίματος ΔΟΤΗ			
	A	B	AB	O
A	Ναι	Όχι	Όχι	Ναι
B	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι
AB	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
O	Όχι	Όχι	Όχι	Ναι

## 2.2. ABO Ασυμβατότητα

Η έλλειψη δοτών οργάνων, ειδικά στις νεφρικές μεταμοσχεύσεις, έχει σαν αποτέλεσμα την συνεχή αύξηση της διαφοράς μεταξύ του αριθμού των ασθενών που βρίσκονται σε κατάλογο αναμονής για νεφρική μεταμόσχευση και του αριθμού των νεφρών που διατίθενται προς μεταμόσχευση. Παρά την αύξηση του αριθμού των μεταμοσχεύσεων από ζωντανό δότη, ένας αριθμός ασθενών δεν μπορεί να κάνει μεταμόσχευση διότι η ομάδα αιματός του είναι ασύμβατη με αυτή του δότη. Η πρώτη απόπειρα μεταμόσχευσης σε άτομα με ασύμβατη ομάδα αίματος άρχισαν να εφαρμόζονται από το 1955 από τον Chug et al. όπου 8 στις 10 μοσχεύσεις νεφρού δεν στέφθηκαν με επιτυχία (Shin and Kim, 2011). Τη δεκαετία του 1980, στην Ιαπωνία καθιερώθηκε η ασύμβατη μετάγγιση, επειδή η σπληνεκτομή, η ενισχυμένη ανοσοκαταστολή και οι πολλαπλές συνεδρίες πλασμαφαίρεσης είχαν συνδυασθεί με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Οι μεταμοσχεύσεις του τύπου αυτού δεν είχαν κερδίσει μεγάλο ενδιαφέρον και γίνονταν στην Ιαπωνία, επειδή δεν υπήρχε άλλη λύση (Schiffer and Kielstein, 2011).



Την τελευταία πενταετία το ενδιαφέρον για τις μεταμοσχεύσεις σε ασθενείς με ABO ασύμβατο ζωντανό δότη όπου εφαρμόζονται τα πρωτόκολλα της απευαισθητοποίησης έχει ανανεωθεί, γεγονός που οφείλεται στην ανακοίνωση ικανοποιητικών μακροχρόνιων αποτελεσμάτων επιβίωσης, σε ερευνα που πραγματοποιήθηκε σε 82 ιδρύματα στην Ιαπωνία μεταξύ 1989 έως 2005. Ο λεπτομερής έλεγχος των αποτελεσμάτων των μεταμοσχεύσεων με ασύμβατη ομάδα αίματος στην Ιαπωνία έδειξε ότι είναι πολύ υψηλό τόσο το ποσοστό των θανάτων των ληπτών, όσο και το ποσοστό απώλειας μοσχευμάτων, λόγω οξείας ή επιταχυνόμενης απόρριψης.

Παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη, Ιαπωνία και Αμερική, εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικά ερωτηματικά, που δεν έχουν απαντηθεί. Έτσι: α) δεν είναι γνωστό το ανώτερο όριο ABO αντισωμάτων που είναι αποδεκτό τη στιγμή της μεταμόσχευσης, για να αποφευχθεί η χυμικού τύπου απόρριψη και β) δεν είναι γνωστό εάν πρέπει να γίνουν συνεδρίες πλασμαφαίρεσης/ανοσοπροσρόφησης μετά τη μεταμόσχευση, σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αντίσωμα έναντι του αντιγόνου CD20, το οποίο βρίσκεται στην επιφάνεια φυσιολογικών και νεοπλασματικών Β-λεμφοκυττάρων.

Ένα άλλο σημαντικό εμπόδιο είναι το υψηλό κόστος των μεταμοσχεύσεων αυτών. Στις Η.Π.Α. το κόστος μιας μεταμόσχευσης νεφρού από ασύμβατο ABO δότη, ανέρχεται στα 38.000 δολάρια. Στην Ευρώπη το κόστος μόνο της ανοσοπροσρόφησης κυμαίνεται από 18.000 έως 36.000 δολάρια. Πρόσφατα δε στις μεταμοσχεύσεις αυτές αναφέρθηκε αυξημένο ποσοστό χειρουργικών επιπλοκών που ανεβάζει το κόστος των μεταμοσχεύσεων ακόμη περισσότερο. Το κόστος των μεταμοσχεύσεων αυτών είναι μικρότερο από το κόστος της αιμοκάθαρσης, αλλά παραμένει απαγορευτικά υψηλό συγκρινόμενο με το κόστος της μεταμόσχευσης από ζώντα δότη (Shin and Kim, 2011).

### 2.3. Προσχηματισμένα ειδικά έναντι του δότη αντισώματα

Έχουν περάσει σχεδόν 40 χρόνια από τότε που αναγνωρίστηκε ο ρόλος των προσχηματισμένων, ειδικών στο δότη HLA κυτταροτοξικών αντισωμάτων (donor specific antibodies-DSA) στην πορεία της μεταμόσχευσης νεφρού, καθώς και η κυτταροτοξική δοκιμασία ιστικής διασταύρωσης (Complement-Dependent Lymprocytotoxicity, CDC), που εφαρμόζεται συστηματικά πριν από κάθε μεταμόσχευση.

Παρολαυτά, η ευαισθητοποίηση πριν τη μεταμόσχευση παρέμενε για πολλά χρόνια ένα σημαντικό πρόβλημα. Ευαισθητοποιημένοι υποψήφιοι λήπτες νεφρικού μοσχεύματος θεωρούνται οι ασθενείς με προσχηματισμένα αντι-HLA αντισώματα, με τίτλο που συνήθως είναι αυξημένος, (panel reactive antibodies-PRA>20%). Πρόκειται για ασθενείς με νεφρική νόσο τελικού σταδίου, οι οποίοι έχουν ευαισθητοποιηθεί σε HLA μετά από κάποιο γεγονός ευαισθητοποίησης, όπως είναι η κύηση, οι μεταγγίσεις αίματος ή προηγούμενη μεταμόσχευση. Οι ευαισθητοποιημένοι ασθενείς περιμένουν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την εξεύρεση μοσχεύματος και εμφανίζουν περισσότερα επεισόδια απόρριψης συγκριτικά με τους μη ευαισθητοποιημένους ασθενείς (Rath, 2013)

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η παραγωγή των αντισωμάτων είναι μία δυναμική διαδικασία και ότι ο τίτλος των HLA αντισωμάτων είναι σημαντικό στοιχείο που καθορίζει την επίδραση που θα έχουν τα αντισώματα στον μεταμοσχευθέντα ιστό. Τα επίπεδα των αντισωμάτων αυξάνονται ή ελαττώνονται με το χρόνο, μία διαδικασία που εξαρτάται από παράγοντες ιδιαίτερους για κάθε ασθενή. Αυτό σημαίνει ότι ένας ασθενής όταν ελεγχθεί νωρίς μετά την ευαισθητοποίηση, θα παρουσιάζει κυτταροτοξικά αντισώματα, πέντε χρόνια αργότερα τα αντισώματα μπορεί να ανιχνεύονται μόνο με πολύ ευαίσθητες τεχνικές, όπως με κυτταρομετρία ροής. Στην περίπτωση αυτή ο πραγματικός κίνδυνος για ένα μόσχευμα εκτιμάται από το ιστορικό του ατόμου όσον αφορά προηγούμενες μεταμοσχεύσεις, μεταγγίσεις, κυήσεις ή άλλα ανοσολογικά γεγονότα που οδηγούν σε αλλοευαισθητοποίηση.

Ο ορισμός της υπερευαισθητοποίησης διαφέρει μεταξύ διαφόρων κέντρων, αλλά πάντως υποδηλώνει την ύπαρξη θετικού crossmatch έναντι ενός μεγάλου

αριθμού δυνητικών δοτών (PRA status). Η ποσοτικοποίηση του γίνεται με την αντίχνευση του ποσοστού των πιθανών δοτών, έναντι των οποίων ο ορός ενός ασθενούς, αντιδρά (θετικό T-cell crossmatch), λόγω προσχηματισμένων IgG αντισωμάτων. Θα πρέπει να τονιστεί πάντως ότι κάποιος υψηλός τίτλος PRA δεν αντικατοπτρίζει απαραίτητα και κάποιο μεγάλο εύρος αντισωμάτων στον ορό του υποψήφιου λήπτη, αλλά αποτελεί και αντανάκλαση της κατανομής των HLA φαινοτύπων στο γενικό πληθυσμό. Για παράδειγμα αφού το HLA A<sub>2</sub> ανευρίσκεται στο 28% του γενικού πληθυσμού, η ύπαρξη και μόνον ενός αντισώματος έναντι αυτού του HLA, έχει ως αποτέλεσμα των αποκλεισμό του 28% των πιθανών δοτών (Gebel, 2003).

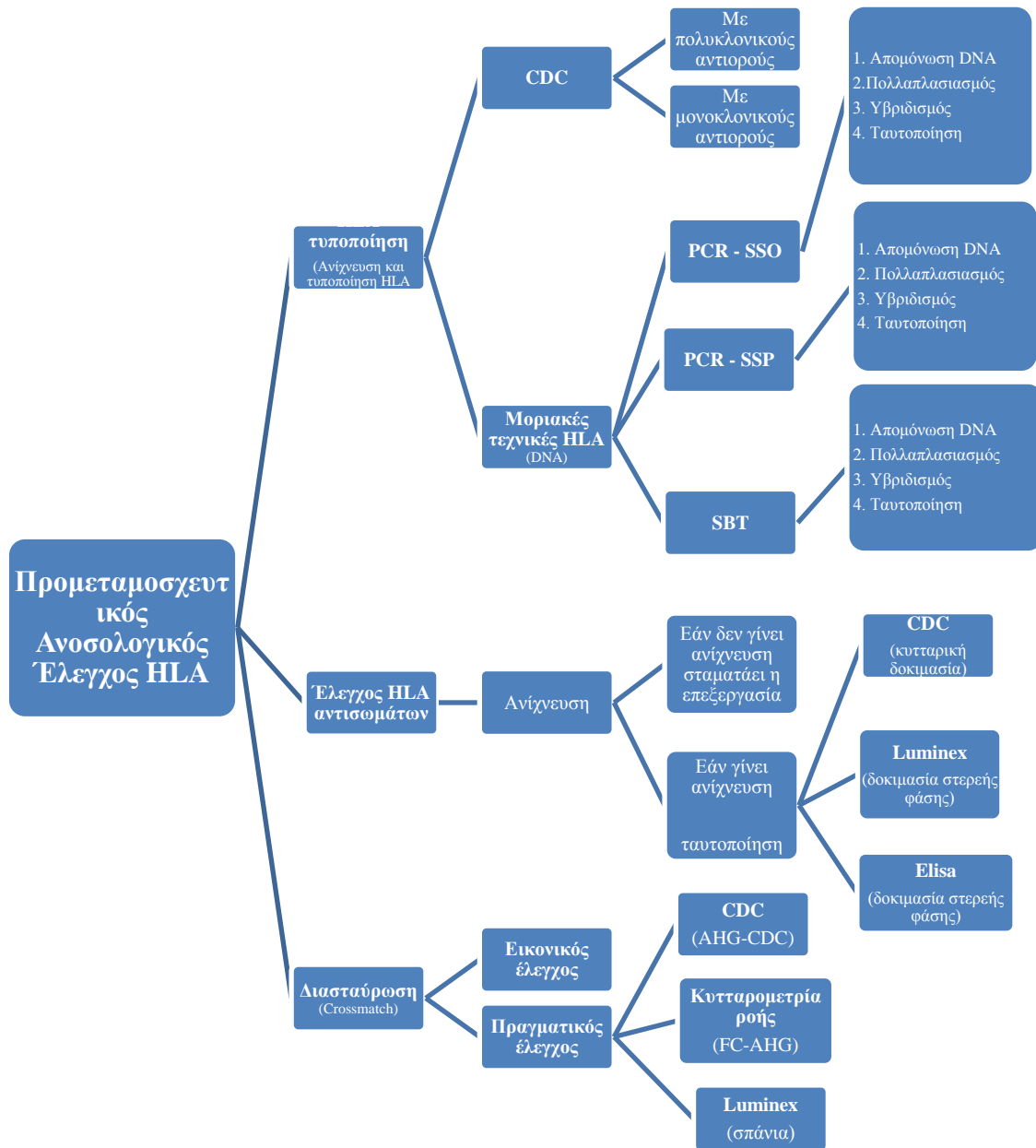
Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία του Εθνικού Οργανισμού Μεταμοσχεύσεων (Οκτώβριος 2007) από τους 819 ασθενείς που είναι ενεργοποιημένοι στη λίστα για πτωματική νεφρική μεταμόσχευση, 79 ασθενείς (9%) παρουσιάζουν τίτλο PRA>70% και θεωρούνται υπερευαίσθητοποιημένοι. Το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο από άλλες χώρες, αλλά μπορεί να εξηγηθεί εύκολα λόγω του μικρού αριθμού μεταμοσχεύσεων στη χώρα μας κατά τα προηγούμενα έτη. Η προσέγγιση του προβλήματος των υπερευαίσθητοποιημένων ασθενών, γίνεται δυσκολότερη από το γεγονός, ότι οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν αυξημένο ανοσολογικό κίνδυνο για εμφάνιση οξείας απόρριψης, μέσω *αντισωμάτων* και σαφώς ελαττωμένη μακρόχρονη επιβίωση των μοσχευμάτων. Οι προϋποθέσεις για μεταμόσχευση ενός υπέρ ευαίσθητοποιημένου λήπτη είναι η απόλυτη συμβατότητα ομάδων αίματος δότη-λήπτη, τουλάχιστον ένα κοινό HLA τάξης I (A ή B) και ένα κοινό HLA τάξης II (DR), αποδεκτή ασυμβατότητα (acceptable mismatch), CDC καθώς και T- και B-flow crossmatch αρνητικά (<http://eom.gr/>).

### **3. Προμεταμοσχευτικός Ανοσολογικός Έλεγχος στη Μεταμόσχευση Νεφρού**

Ο ανοσολογικός προμεταμοσχευτικός έλεγχος του ζεύγους δότη-λήπτη νεφρικού μοσχεύματος είναι ουσιαστικής σημασίας για την επιβίωση του μοσχεύματος και περιλαμβάνει:

- α) το σύστημα των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων και
- β) το σύστημα ιστοσυμβατότητας ή HLA
  - Ανίχνευση και τυποποίηση HLA αντίγονων
  - Έλεγχος HLA αντισωμάτων
  - Διασταύρωση (crossmatch) (πίνακας 5)

Πίνακας 5: Προμεταμοσχευτικός ανοσολογικός έλεγχος (Αποστολάκη, 2013)



### 3.1. Τεχνικές τυποποίησης HLA μορίων

Ο βαθμός της συμβατότητας δότη - λήπτη, ως προς τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, έχει μεγάλη σχέση με την επιβίωση του νεφρικού μοσχεύματος. Η τυποποίηση των HLA μορίων με ορολογικές μεθόδους χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα κατά τη διάρκεια των τελευταίων 40 ετών, κυρίως για την τυποποίηση των HLA I & II αντιγόνων. Η ιδιοφυής ανακάλυψη της PCR τεχνικής και η επακόλουθη ανάπτυξη των μεθόδων της μοριακής βιολογίας σηματοδότησε στα μέσα της δεκαετίας του 1980 μια νέα εποχή στη μεθοδολογία τυποποίησης των HLA μορίων και οδήγησε στη βαθμιαία αντικατάσταση της ορολογικής τυποποίησης από τις μοριακές τεχνικές, κυρίως για την τυποποίηση των HLA τάξης II μορίων (Leffell, 2001).

#### ΑΡΧΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

##### Σκοπός

Τα κυτταρικά περιεχόμενα του περιφερικού αίματος, της σπλήνας και των λεμφαδένων έχουν μεγάλη ετερογένεια και περιέχουν κοκκιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια και μονοκύτταρα. Καθώς όλες οι ορολογικές μέθοδοι έχουν καλύτερα αποτελέσματα με καθαρούς πληθυσμούς κύτταρων η απομόνωση και ο καθαρισμός των κυτταρικών πληθυσμών είναι απαραίτητα στο εργαστήριο. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο στηρίζονται σε εσωτερικά και εξωτερικά χαρακτηριστικά των κύτταρων για τον διαχωρισμό τους. Τα εσωτερικά χαρακτηριστικά, περιλαμβάνουν το μέγεθος τη διαφάνεια και την κοκκίωση του κυττάρου, ενώ τα εξωτερικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν τη δυνατότητα προσκόλλησης, την έκφραση δεικτών επιφάνειας, καθώς και τη φαγοκυτταρική ικανότητα του (Leffel, 2001)

**Πίνακας 6:** Μέθοδοι τυποποίησης HLA μορίων

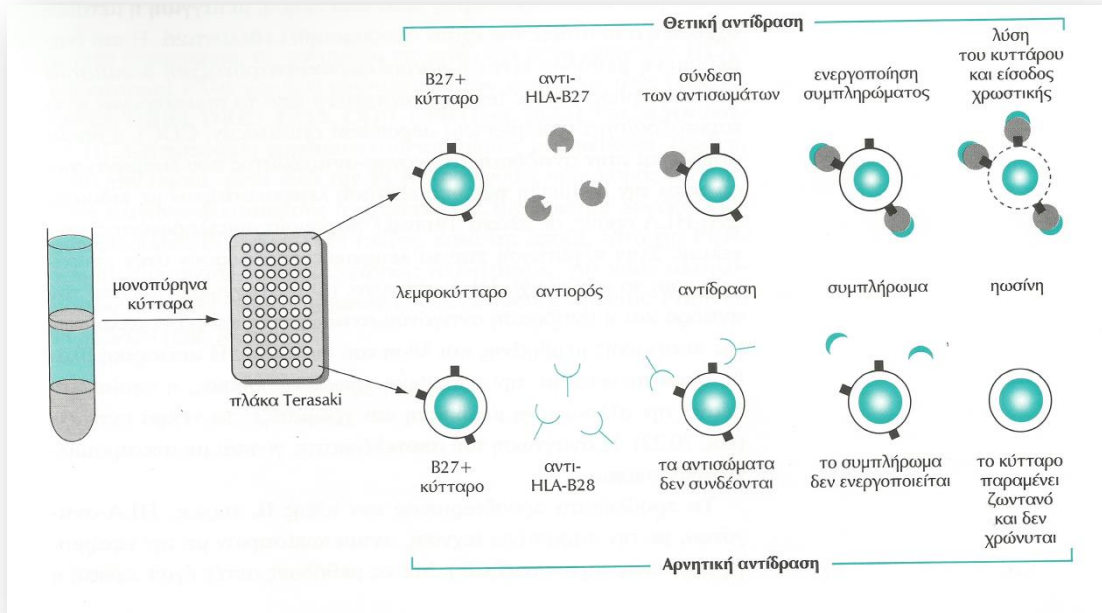
Μέθοδος	Αρχή Μεθόδου	Εφαρμογή
<b>Ορολογικές</b> Μικρολεμφοκυτταροτοξική μεθόδος δύο σταδίων (Complement-Dependent Lymprocytotoxicity, CDC)	Αντίδραση αντιγόνου- αντισώματος παρουσία συμπληρώματος	Τυποποίηση HLA μορίων σε επίπεδο πρωτεϊνών (HLA I & II αντιγόνα)
<b>Μοριακές</b> PCR-SSOP PCR-SSP	PCR τεχνική και χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων	Τυποποίηση HLA μορίων σε επίπεδο αλληλίων

### 3.1.1 Ορολογική τυποποίηση HLA αντιγόνων με μικρολεμφοκυτταροτοξική τεχνική (Complement-Dependent Lymprocytotoxicity, CDC)

Τα αντιγόνα HLA τάξης I και II προσδιορίζονται στα T και B-κύτταρα αντίστοιχα, με τη χρήση πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντι-HLA αντιορών. Οι πολυκλωνικοί αντιοροί προέρχονται από άτομα που έχουν ανοσοποιηθεί ως προς τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας μετά από κύηση, μετάγγιση ή μεταμόσχευση (Leffell, 2001). Η πιο διαδεδομένη μέθοδος είναι η μικρολεμφοκυτταρική δοκιμασία εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (Complement-Dependent Lymprocytotoxicity, CDC), η οποία στηρίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος, που λαμβάνει χώρα κατά την ανάμειξη των υπό εξέταση λεμφοκυττάρων με ειδικούς αντι-HLA ορούς, σε πλάκα Terasaki, παρουσία συμπληρώματος κουνελιού.

Στην περίπτωση που τα λεμφοκύτταρα φέρουν στην επιφάνεια τους το αντίστοιχο HLA-αντιγόνο, αυτό αναγνωρίζεται από τον αντιορό και η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος επιφέρει αλλοίωση της κυτταρικής μεμβράνης και λύση του κυττάρου. Η κυτταρική βλάβη διαπιστώνεται με την προσθήκη χρωστικής ουσίας, η οποία διαπερνά την αλλοιωμένη μεμβράνη και χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα (εικόνα

8). Η ανάγνωση του αποτελέσματος γίνεται με ανεστραμμένο μικροσκόπιο (Γερμένης, 2000).



Εικόνα 8: Η μικρολεμφοκυτταροτοξική δοκιμασία. Τα λεμφοκύτταρα διαχωρίζονται από το αίμα με φυγοκέντρηση παρουσία Ficoll-Hyraque. Στη συνέχεια, ποσότητα από το εναιώρημα λεμφοκυττάρων εναποτίθεται στα φρεάτια της πλάκας Terasaki, που έχουν προεπιστρωθεί με αντιορούς έναντι των διαφόρων HLA-αντιγόνων. Στην εικόνα, φαίνονται οι αντιδράσεις λεμφοκυττάρων που φέρουν το αντιγόνο HLA-B 27, με τους αντιορούς έναντι του HLA-B 27 και του HLA-B 8. Ο αντι- HLA-B 27 αντιορός αντιδρά, πάνω στην κυτταρική μεμβράνη, με το HLA-B 27 και συνδέει το συμπλήρωμα, με αποτέλεσμα τη μεμβρανική βλάβη, η οποία επιτρέπει την είσοδο της χρωστικής (ηωσίνη) στο νεκρό πλέον κύτταρο (θετική δοκιμασία). Αντίθετα, η μη αντίδραση του αντι- HLA-B 8 αντιορού δεν παραβλάπτει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, με συνέπεια τα αρνητικά γι' αυτό τα αντιγόνα κύτταρα να μη χρωματίζονται (αρνητική δοκιμασία) ( Ανατόπωση από Γερμένης, 2000).



### 3.1.2. Μοριακή τυποποίηση HLA αντιγόνων με PCR τεχνική και χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων

Η τυποποίηση των HLA αντιγόνων με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR ) αναπτύχθηκε παράλληλα με κάθε άλλη βιολογική εφαρμογή της μεθόδου. Παρόλα αυτά, ο εξαιρετικά μεγάλος πολυμορφισμός των HLA γονιδίων αποτέλεσε πρόκληση για τους μοριακούς βιολόγους. Έτσι, τα HLA γονίδια διεκδίκησαν την πρωτοπορία σε κάθε νέα, βασισμένη στην PCR μέθοδο.

#### Ενίσχυση με τη μέθοδο της PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης αποτελεί ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA σε συνθήκες εργαστηρίου (*in vitro*). Με τη μέθοδο της PCR επιτυγχάνεται μέσα σε ελάχιστο χρονικό διάστημα (2-3 ώρες), η εκθετική ενίσχυση της ακολουθίας DNA, έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η μελέτη και ο περαιτέρω χειρισμός της. Η τεχνική αυτή βασίζεται στον ημισυντηρητικό τρόπο διπλασιασμού του DNA, σε συνδυασμό με τη χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών. Η χρήση της Taq πολυμεράσης του θερμοφίλου βακτηρίου *Thermus aquaticus*, σε συνδυασμό με τη βελτίωση της ποιότητας των θερμοκυκλοποιητών, έχει βελτιώσει σημαντικά την πιστότητα της μεθόδου. Η αντίδραση αυτή χαρακτηρίζεται από ευαισθησία, ειδικότητα και ταχύτητα.

Η αντίδραση PCR εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1985, από το Mullis και τους συνεργάτες του, οι οποίοι ολοκλήρωσαν αυτή την τεχνική πολλαπλασιασμού του DNA βασιζόμενοι σε *in vitro* διαδικασίες (Saiki *et al.* 1985, Saiki *et al.* 1988). Για την εφαρμογή της μεθόδου είναι απαραίτητη η ύπαρξη μικρής ποσότητας DNA, η οποία θα αποτελέσει την αρχική μήτρα αντιγραφής (template DNA) για το τμήμα που πρόκειται να ενισχυθεί. Ως υπόστρωμα της αντίδρασης, εκτός από το γονιδιωματικό DNA (από ένα μόνο κύτταρο ή και τμήματα χρωμοσωμάτων), μπορεί να χρησιμοποιηθεί RNA (από λίγα μόνο κύτταρα), ή ακόμα και προϊόντα προηγούμενης αντίδρασης PCR. Η τεχνική απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αρχικού

υλικού και υπάρχει δυνατότητα ενίσχυσης ενός και μόνο μορίου DNA με εκθετικό τρόπο.

Επίσης, απαιτείται ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), που οριοθετούν την προς πολλαπλασιασμό περιοχή (target sequence). Οι εκκινητές υβριδίζονται σε συμπληρωματικές ακολουθίες πάνω στο DNA, ενώ τα 5' άκρα τους καθορίζουν τα άκρα της προς ενίσχυση ακολουθίας. Ο ένας εκκινητής συνδέεται στον μεταγραφόμενο κλώνο του DNA (forward ή upstream primer), ενώ ο άλλος στο συμπληρωματικό κλώνο (reverse ή downstream primer). Στατιστικά έχει βρεθεί ότι όταν μια αλληλουχία DNA έχει μήκος από 20 ζεύγη βάσεων και πάνω (20 bp), τότε είναι μοναδική στο γονιδίωμα. Άρα, προκειμένου να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση μιας αλληλουχίας, οι εκκινητές πρέπει να είναι τουλάχιστον 20-μερή. Γενικά, οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν τα εξής χαρακτηριστικά (Bangham 1991):

- Το μήκος τους να κυμαίνεται από 18 έως 30 νουκλεοτίδια.
- Η σύσταση γουανίνης–κυτοσίνης (G-C) πρέπει να είναι παρόμοια με εκείνη του DNA – στόχου.
- Να μην υπάρχει συμπληρωματικότητα μεταξύ του ζευγαριού των εκκινητών, καθώς και μεταξύ διαφορετικών περιοχών του ίδιου εκκινητή, ώστε να αποφεύγεται η πρόκληση δευτεροταγών δομών.
- Να μην υπάρχουν τρεις ή περισσότερες γουανίνες ή κυτοσίνες στη σειρά στο 3' άκρο του εκκινητή.
- Να μην υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των δύο εκκινητών στο 3' άκρο, για αποφυγή εμφάνισης διμερών των εκκινητών.
- Για καθένα από τους δύο εκκινητές ισχύει:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

Η παράμετρος  $T_m$  είναι η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται αποδιάταξη του 50% των δίκλωνων μορίων DNA, που σχηματίζονται ανάμεσα στον εκκινητή και την περιοχή που αυτός υβριδίζεται πάνω στη μητρική αλυσίδα, γεγονός που προκαλείται από τη διάσπαση των υδρογονικών δεσμών. Οι τιμές της θερμοκρασίας αυτής, καθορίζονται από τη σύσταση του κάθε εκκινητή σε αδενίνη

(A) και θυμίνη (T), μεταξύ των οποίων αναπτύσσονται δύο δεσμοί υδρογόνου, καθώς και από τη σύσταση σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C), μεταξύ των οποίων αναπτύσσονται τρεις δεσμοί υδρογόνου.

Μετά από τον υπολογισμό της θερμοκρασίας  $T_m$  για καθέναν από τους δύο εκκινητές σύμφωνα με τον παραπάνω μαθηματικό τύπο, αφαιρούνται 5 °C από τη χαμηλότερη τιμή  $T_m$  που προέκυψε. Η τελική τιμή που προκύπτει, είναι η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (θερμοκρασία annealing) κατά τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Maniatis *et al.* 1982). Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών, η διαδικασία ανεύρεσης των καταλληλότερων συνθηκών της αντίδρασης PCR περιλαμβάνει πειράματα, στα οποία σταδιακά μεταβάλλονται ανεξάρτητα μεταξύ τους τόσο η θερμοκρασία αναδιάταξης, όσο και η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$ , που είναι απαραίτητα για την ενζυμική αντίδραση.

### Συστατικά της PCR

Τα συστατικά που είναι απαραίτητα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA με τη μέθοδο PCR είναι τα ακόλουθα (Saiki *et al.* 1988):

- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση σύνδεσης πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων από μονομερή τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), χρησιμοποιώντας ως μήτρα τη μια από τις δύο αρχικές αλυσίδες DNA. Στη μέθοδο PCR χρησιμοποιείται, όπως προαναφέρθηκε, η πολυμεράση που απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq polymerase). Το ένζυμο αυτό αποτελείται από μία πεπτιδική αλυσίδα με μοριακό βάρος 94kDa. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι οι 72 °C, ωστόσο η Taq πολυμεράση παραμένει σταθερή μέχρι και τους 94° C.
- Κατάλληλη συγκέντρωση  $MgCl_2$ . Η προσθήκη διαλύματος  $MgCl_2$  αποσκοπεί στην παροχή ιόντων μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ), τα οποία είναι απαραίτητα για την ενζυμική δράση της πολυμεράσης και χρησιμοποιούνται ως “μεταλλικός

συμπαράγοντας” κατά την ενζυμική αντίδραση. Η τελική τους συγκέντρωση είναι σημαντική για την επιτυχία της PCR, αφού περίσσεια ιόντων  $Mg^{2+}$  προκαλεί αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης, ενώ έλλειψη  $Mg^{2+}$  ελαττώνει την ποσότητα των προϊόντων. Συνήθως χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις 1,5–2,5mM.

- Ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) των αζωτούχων βάσεων αδενίνης, θυμίνης, κυτοσίνης και γουανίνης (dATP, dTTP, dCTP και dGTP), τα οποία θα αποτελέσουν τα δομικά υλικά των νεοσχηματιζόμενων μορίων DNA, ενώ παράλληλα από αυτά προέρχεται και η ενέργεια πολυμερισμού. Η συγκέντρωσή τους στο μίγμα αντίδρασης ποικίλει μεταξύ 50 και 200μM. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μειώνουν το ρυθμό σύνθεσης DNA (παρεμπόδιση από το υπόστρωμα) και μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων. Στο μίγμα αντίδρασης προσθέτουμε καθορισμένη ποσότητα ισομερούς μίγματος και των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων.
- Κατάλληλη ποσότητα δις-απεσταγμένου και απιονισμένου νερού, το οποίο αποτελεί τον διαλύτη μέσα στον οποίο θα λάβει χώρα η αντίδραση πολυμερισμού. Το νερό επιπλέον αυξάνει τον όγκο της αντίδρασης, έτσι ώστε να υπάρχει ο απαραίτητος χώρος για την αναδίπλωση του αρχικού μορίου DNA, καθώς και των θυγατρικών αλυσίδων, που θα προκύψουν από τον πολυμερισμό.
- Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (PCR Buffer), το οποίο ρυθμίζει το χημικό περιβάλλον της αντίδρασης, αφενός καθορίζοντας το pH στην περιοχή της βέλτιστης δράσης της πολυμεράσης, αφετέρου, προμηθεύει τους απαραίτητους συμπαράγοντες και σταθεροποιητικές ουσίες για τη μέγιστη απόδοση της πολυμεράσης.

## Στάδια της PCR

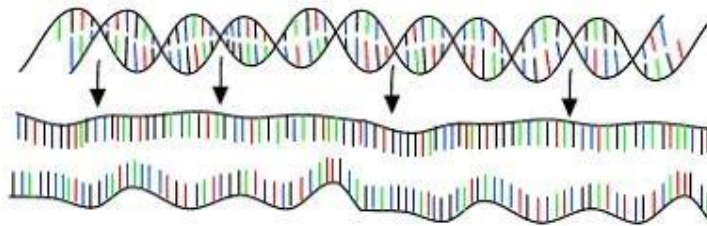
Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ξεκινά συνήθως με ένα αρχικό στάδιο θερμικής αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 5 min. Ακολουθούν 30-35 πανομοιότυποι κύκλοι, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια (Εικόνα 9):

- Θερμική αποδιάταξη (Denaturation) στους 95 °C, που οδηγεί στον αποχωρισμό των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατό στους εκκινητές να έρθουν και να παρεμβληθούν μέσα στο DNA κατά το επόμενο στάδιο.
- Υβριδισμός των εκκινητών (Annealing) στους 55-60 °C στη μήτρα αντιγραφής. Αυτό επιτυγχάνεται, με την πτώση της θερμοκρασίας στην τιμή εκείνη, που είναι κατάλληλη για τον υβριδισμό (θερμοκρασία annealing).
- Πολυμερισμός (Extension) στους 72 °C, κατά τον οποίο πραγματοποιείται σύνθεση των συμπληρωματικών ακολουθιών με τη δράση της Taq πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη και ως πηγή ενέργειας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).

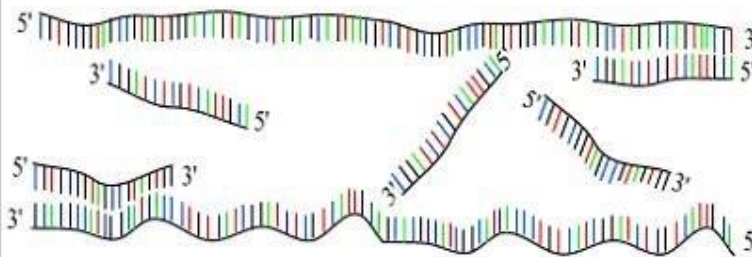
Στο τέλος των επαναλαμβανόμενων κύκλων προστίθεται ένα χρονικό διάστημα λίγων λεπτών στους 72 °C, στάδιο κατά το οποίο η πολυμεράση ολοκληρώνει τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων, που ενδεχομένως δεν έχει πραγματοποιηθεί. Ο πολλαπλασιασμός της συγκεκριμένης περιοχής DNA είναι εκθετικός. Το τελικό αποτέλεσμα της PCR μετά από  $n$  κύκλους είναι η παραγωγή  $2^n$  δίκλωνων μορίων DNA, πιστών αντιγράφων της ακολουθίας που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης καθιστά δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών, ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων, ή όταν το DNA έχει υποστεί σχετική αποδιάταξη. Η χρονική διάρκεια όλων των σταδίων θα πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατόν μικρότερη προς αποφυγή παραγωγής μη ειδικών προϊόντων.

## PCR : Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

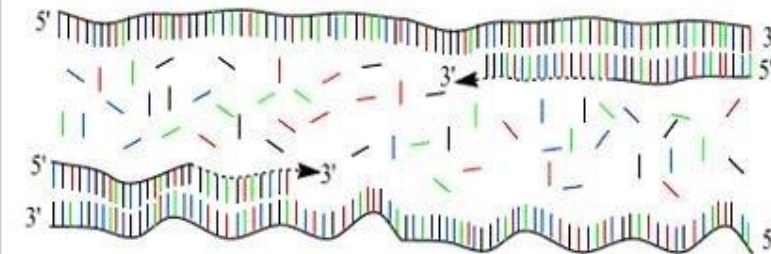
30-40 κύκλοι  
3 βημάτων



**Βήμα 1<sup>ο</sup>: αποδιάταξη**  
1 min στους 94 °C



**Βήμα 2<sup>ο</sup>: υβριδισμός**  
45 sec στους 54 °C



**Βήμα 3<sup>ο</sup>: πολυμερισμός**  
2 min στους 72 °C

(Andy Vierstraete 1999)

Εικόνα 9: Σχηματική παράσταση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με τα επιμέρους στάδια κάθε κύκλου, (Ανατύπωση από <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

## Ευρέως χρησιμοποιούμενες παραλλαγές της PCR

Οι DNA μέθοδοι τυποποίησης, οι PCR-SSOP και PCR-SSP είναι αυτές που χρησιμοποιούνται κυρίως σε επίπεδο ρουτίνας στα εργαστήρια ιστοσυμβατότητας για την τυποποίηση των HLA, αφού η προτυποποίησή τους είναι δυνατή με τη συμμετοχή των εργαστηρίων ιστοσυμβατότητας στα σχήματα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου και τα συστήματα πιστοποίησης από διεθνείς οργανισμούς στον τομέα της ανοσογενετικής (EFI, ASHI). Τελευταία έχει αρχίσει να εφαρμόζεται στα εργαστήρια ιστοσυμβατότητας σε επίπεδο ρουτίνας και η SBT.

Η PCR-SSO περιλαμβάνει i) την ενίσχυση του DNA-στόχου (DNA amplification) με ειδική για την κάθε γονιδιακή θέση PCR (2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> εξόνιο των HLA τάξης I γονιδίων και 2<sup>ο</sup> εξόνιο των HLA τάξης II γονιδίων) και ii) τον υβριδισμό (blotting) του προϊόντος της PCR με ειδικής αλληλουχίας ανιχνευτές. Στην περίπτωση που στο προϊόν της PCR περιέχεται αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς την αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου - ανιχνευτή δημιουργείται υβρίδιο μόριο DNA, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να ανιχνευθεί με αυτοραδιογραφία, φωτομετρική μέθοδο ή με φθορισμό.

Στην πράξη μπορούν να εφαρμοστούν δύο τεχνικές υβριδισμού: ο κλασικός υβριδισμός (forward SSO) και ο ανάστροφος (reverse SSO). Στην πρώτη τεχνική το προϊόν της PCR μεταφέρεται σε nylon μεμβράνη ή πλάκα μικροτιτλοποίησης και ο κάθε ανιχνευτής που έχει προηγουμένως σημειωθεί ιστοπικά (<sup>32</sup>P) ή ενζυμικά (διγοξιγενίνη, αλκαλική φωσφατάση) προστίθεται ξεχωριστά. Στη δεύτερη τεχνική οι ειδικοί ανιχνευτές είναι ακινητοποιημένοι σε μεμβράνες ή πλάκες μικροτιτλοποίησης και ακολουθεί η προσθήκη του προϊόντος της PCR, που η σήμανσή του έχει πραγματοποιηθεί με βιοτινυλιωμένους εκκινητές κατά την εκτέλεση της PCR αντίδρασης. Η πρώτη τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί για την τυποποίηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, ενώ η δεύτερη παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης τυποποίησης πολλών τόπων μικρότερου όμως αριθμού δειγμάτων, ενώ παράλληλα προϋποθέτει τη χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων. Ακόμη στις τεχνικές υβριδισμού μπορούν να εφαρμοστούν δύο στρατηγικές τυποποίησης. Η πρώτη περιλαμβάνει μία μόνο PCR και τη χρήση μεγάλου αριθμού ανιχνευτών έτσι

ώστε να καλύπτονται όλοι οι πολυμορφισμοί. Η δεύτερη αποτελεί τη στρατηγική των δύο σταδίων κατά την οποία στο πρώτο στάδιο γίνεται με την επιλογή των ανάλογων ανιχνευτών η τυποποίηση των HLA σε επίπεδο ορολογικών ειδικοτήτων και στο δεύτερο στάδιο με βάση τα αποτελέσματα της τυποποίησης του πρώτου σταδίου πραγματοποιείται η τυποποίηση των HLA σε επίπεδο αλληλίων με την επιλογή των ανάλογων ανιχνευτών (Middleton D and F. Williams, 2002).

Η PCR-SSP χαρακτηρίζεται από πολλαπλές PCRs, κάθε μία από τις οποίες είναι ειδική για ένα αλληλίο ή συνήθως για μια ομάδα αλληλίων που αντιστοιχούν σε ένα αντιγόνο. Η ειδικότητα της PCR-SSP είναι αποτέλεσμα της πλήρους συμπληρωματικότητας του ενός ή και των δύο εκκινητών στο 3' άκρο τους με την αλληλουχία του DNA-στόχου. Στην πράξη για την τυποποίηση μιας γονιδιακής θέσης απαιτείται η εκτέλεση πολλαπλών PCR αντιδράσεων κάτω από ιδανικές συνθήκες, που αφορούν στη συγκέντρωση των συστατικών της PCR (template, Taq πολυμεράση, dNTPs, Tris και ιόντα Mg). Τα κλάσματα του DNA που προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό, διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. Η ανίχνευσή τους γίνεται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η παρουσία του ειδικού προϊόντος υποδηλώνεται με την ύπαρξη ζώνης συγκεκριμένου μεγέθους με βάση πρότυπο DNA γνωστού μοριακού μεγέθους (ladder). Παράλληλα η επιτυχία της αντίδρασης ελέγχεται με την προσθήκη σε κάθε αντίδραση θετικού μάρτυρα, δηλαδή ενός ζεύγους εκκινητών που πολλαπλασιάζουν μία συντηρημένη περιοχή του DNA (housekeeping gene).

### Τεχνική PCR-SSP

Η μεθοδολογία PCR-SSP βασίζεται στην αρχή ότι οι πλήρως ταυτιζόμενοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές χρησιμοποιούνται πιο αποτελεσματικά στην ενίσχυση μιας αλληλουχίας-στόχου σε σύγκριση με ένα μη ταυτιζόμενο ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή από ανασυνδυασμένη Taq πολυμεράση. Τα ζεύγη εκκινητών είναι σχεδιασμένα να ταυτίζονται απόλυτα μόνο με ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο ή μια ομάδα αλληλόμορφων. Υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες PCR, τα ζεύγη εκκινητών που ταυτίζονται απόλυτα προκαλούν την ενίσχυση των αλληλουχιών-στόχων (δηλαδή, θετικό αποτέλεσμα) ενώ τα μη ταυτιζόμενα ζεύγη



εκκινητών δεν προκαλούν ανάλογη ενίσχυση (δηλαδή, αρνητικό αποτέλεσμα). Μετά τη διεργασία PCR, τα ενισχυμένα τμήματα DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης και οπτικοποιούνται με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων PCR-SSP βασίζεται στην παρουσία ή απουσία ενός συγκεκριμένου ενισχυμένου τμήματος DNA. Επειδή η ενίσχυση κατά την αντίδραση PCR μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από διάφορους παράγοντες (λάθη κατά τη χρήση της πιπέτας, κακή ποιότητα DNA, παρουσία αναστολέων, κλπ.), σε κάθε αντίδραση PCR reaction περιλαμβάνεται ένα ζευγάρι εκκινητών εσωτερικού ελέγχου. Το ζευγάρι εκκινητών μαρτύρων ενισχύει μια διατηρηθείσα περιοχή του γονιδίου της Ανθρώπινης β-σφαιρίνης, η οποία είναι παρούσα σε όλα τα δείγματα ανθρώπινου DNA και χρησιμοποιείται για να επαληθεύει την ακεραιότητα της αντίδρασης PCR. Όταν υπάρχει θετική ζώνη εξακρίβωσης (ειδική ενίσχυση ενός αλληλόμορφου HLA), το προϊόν του ζευγαριού εκκινητών εσωτερικού ελέγχου μπορεί να είναι ασθενές ή να απουσιάζει λόγω των διαφορών στη συγκέντρωση και στις θερμοκρασίες τήξης μεταξύ των συγκεκριμένων ζευγαριών εκκινητών και του ζευγαριού εκκινητών εσωτερικού ελέγχου. Τα ενισχυμένα τμήματα DNA των συγκεκριμένων ζευγαριών εκκινητών HLA είναι μικρότερα από το προϊόν του ζευγαριού εκκινητών εσωτερικού ελέγχου, αλλά μεγαλύτερα από τη διάχυτη ζώνη του μη συγχωνευμένου εκκινητή. Επομένως, μια θετική αντίδραση για ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο ή ομάδα αλληλόμορφων HLA οπτικοποιείται στη γέλη ως ενισχυμένο τμήμα DNA μεταξύ της ζώνης του προϊόντος εσωτερικού ελέγχου και της ζώνης του μη συγχωνευμένου εκκινητή.

Η επιλογή της DNA μεθόδου γίνεται με βάση την ειδικότητα και την ευαισθησία της τεχνικής, τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να τυποποιηθούν, το κόστος για κάθε δείγμα, τις δυνατότητες τεχνολογικού εξοπλισμού, την εμπειρία και την εξειδίκευση του προσωπικού και το επίπεδο ανάλυσης που απαιτείται στην κλινική πράξη. Αναμφίβολα η πιο αναλυτική από τις DNA μεθόδους είναι η SBT που εφαρμόζεται στις περιπτώσεις που απαιτείται τυποποίηση HLA σε επίπεδο υψηλής ανάλυσης.

Οι προοπτικές που διαγράφονται στο μέλλον συμπεριλαμβάνουν στην HLA τυποποίηση και την ανίχνευση των πολυμορφισμών σε επίπεδο νουκλεοτιδίου

(Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) με την εφαρμογή της νέας τεχνολογίας (mass spectrometry, arrays) ( Bunce, 2002).

### 3.2. Έλεγχος HLA αντισωμάτων

Καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία της μεταμόσχευσης παίζει η ανίχνευση των HLA αντισωμάτων έναντι των HLA τάξης I και II αντιγόνων. Η ύπαρξη τους έχει συσχετιστεί με επεισόδια οξείας απόρριψης, απώλεια και πτωχή επιβίωση του μοσχεύματος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, μέχρι σήμερα, για την ανίχνευση των αντι-HLA αντισωμάτων βασίζονται στην αρχή της αντίδρασης τους με τα κύτταρα-στόχους παρουσία συμπληρώματος και σε μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με κεκαθαμένα HLA I & II αντιγόνα (πίνακας 7).

Πίνακας 7: Μέθοδοι ταυτοποίησης HLA αντισωμάτων

Μέθοδος	Αρχή Μεθόδου	Εφαρμογή
<b>Κυτταρική δοκιμασία</b> Μικρολεμφοκυτταροτοξική μέθοδος (Complement-Dependent Lymphocytotoxicity, CDC)	Αντίδραση με κύτταρα-στόχους παρουσία συμπληρώματος	Ταυτοποίηση HLA αντισωμάτων
<b>Δοκιμασία στερεής φάσης</b> Elisa Luminex	Μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με κεκαθαμένα HLA I & II αντιγόνα	Ταυτοποίηση HLA αντισωμάτων σε μοριακό επίπεδο

#### 3.2.1. Κυτταρικές δοκιμασίες

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, μέχρι σήμερα, για την ανίχνευση των αντι-HLA αντισωμάτων βασίζονται στην αρχή της αντίδρασης τους με τα κύτταρα-στόχους (εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα complement dependent cytotoxicity, CDC). Στην CDC, ο ορός του ασθενούς ελέγχεται έναντι σειράς (panel-reactive antibodies-%PRA) *T* και *B*-κυττάρων, τυχαίων ατόμων γνωστής αντιγονικής HLA-ταυτότητας. Η αντίδραση των λεμφοκυττάρων του panel με

τα αντι-HLA αντισώματα του ασθενούς, παρουσία συμπληρώματος, προκαλεί λύση των λεμφοκυττάρων (θετική αντίδραση), που γίνεται ορατή με την ηωσίνη χρώση (eosin). Το γεγονός αυτό επιτρέπει μια πρώτη προσέγγιση του βαθμού ευαισθητοποίησης του ασθενούς. Τα κύρια μειονεκτήματα της τεχνική CDC είναι τα εξής: εξαρτάται από την κατάσταση των χρησιμοποιούμενων λεμφοκυττάρων, ανιχνεύει μόνο αντισώματα που συνδέουν το συμπλήρωμα και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι υποκειμενική και πολλές φορές πολύπλοκη, καθώς η μέθοδος ανιχνεύει εκτός από αντι-HLA αλλοαντισώματα και αυτοδραστικά αντισώματα (κυρίως IgM), που δεν στρέφονται έναντι του μοσχεύματος (Leffell M.S, 2001)

Ο λεπτομερέστερος έλεγχος των υποψήφιων ληπτών αποσκοπεί, τόσο στην ανίχνευση των αντι-HLA αντισωμάτων, όσο και στον προσδιορισμό της ειδικότητάς τους. Ο καθορισμός της ειδικότητας των αντι-HLA αντισωμάτων είναι πρωταρχικής σημασίας, αφού με βάση αυτή μπορούν να αποκλειστούν εκ των προτέρων μοσχεύματα με HLA-αντιγόνα, έναντι των οποίων ο συγκεκριμένος υποψήφιος λήπτης έχει αναπτύξει αντι-HLA αντισώματα. Απαραίτητος είναι, επίσης, ο καθορισμός της τάξης των αντι-HLA αντισωμάτων. Κατά κανόνα, καταστροφικά για το μόσχευμα είναι τα IgG-αντισώματα. Η επεξεργασία του ορού με διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol, DTT) πολυμερίζει τα IgM-αντισώματα και επιτρέπει τον προσδιορισμό των IgG-αντισωμάτων (Ταράση, 2010).

### **Τεχνική Ταυτοποίησης HLA αντισωμάτων**

Τα λεμφοκύτταρα με γνωστά αντιγόνα επωάζονται με έναν άγνωστο ορό και συμπλήρωμα κουνελιού. Αν ο ορός περιέχει αντισώματα, τα οποία είναι σε θέση να δεσμεύονται ειδικά σε εκείνα τα αντιγόνα, που είναι παρόντα στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων, μπορεί να συμβεί κυτταρόλυση μέσω συμπληρώματος.

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων ακολουθείται η κλίμακα βαθμολογίας που περιγράφεται στον προσδιορισμό των HLA-αντιγόνων. Στη συνέχεια, ο υπολογισμός του επι τοις εκατό ποσοστού των θετικών αντιδράσεων (%PRA) γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Ποσοστό θετικών αντιδράσεων (\% PRA)} = \frac{\text{Αριθμός θετικών αντιδράσεων}}{\text{Αριθμός κυττάρων στο panel}} \times 100$$

Ο προσδιορισμός της ειδικότητας των anti-HLA αντισωμάτων γίνεται ως εξής:

1. Σημειώνονται όλα τα HLA αντιγόνα του κυττάρου που δίνει θετική αντίδραση σε μια θέση.
2. Υπολογίζεται π αριθμός των «θετικών» αντιδράσεων και στη θέση του πλάνου με την ένδειξη « θετικές αντιδράσεις (+/+ )» σημειώνεται ο συνολικός αριθμός των θετικών αντιδράσεων που δίνει ένα HLA-αντιγόνο. Στην περίπτωση που ο αριθμός των θετικών αντιδράσεων είναι μεγαλύτερος από το μισό της συχνότητας εμφάνισης του αντιγόνου, τότε πιθανώς να έχει αναπτυχθεί αντι-HLA αντίσωμα έναντι του συγκεκριμένου HLA-αντιγόνου.
3. Υπολογίζεται ο αριθμός των «ψευδώς θετικών αντιδράσεων» (θετικές αντιδράσεις στις θέσεις που δεν υπάρχει το πιθανό HLA-αντιγόνο έναντι του οποίου έχουν αναπτυχθεί αντι- HLA αντισώματα). Αυτός ο αριθμός των «εσφαλμένως θετικών αντιδράσεων» σημειώνεται στη θέση του πλάνου με την ένδειξη «ψευδώς θετικές αντιδράσεις (+/-)».  
Υπολογίζεται ο αριθμός των «ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων» (αρνητικές αντιδράσεις στις θέσεις που υπάρχει το πιθανό HLA-αντιγόνο έναντι του οποίου έχουν αναπτυχθεί αντι-HLA αντισώματα). Αυτός ο αριθμός των εσφαλμένως αρνητικών αντιδράσεων» σημειώνεται στη θέση του πλάνου με την ένδειξη «ψευδώς αρνητικών αντιδράσεις (-/+ )».
4. Υπολογίστε για κάθε ειδικότητα, την τιμή r ή το συντελεστή συσχέτισης.

$$r = \frac{(AD) - (BC)}{[(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)]^{1/2}}$$

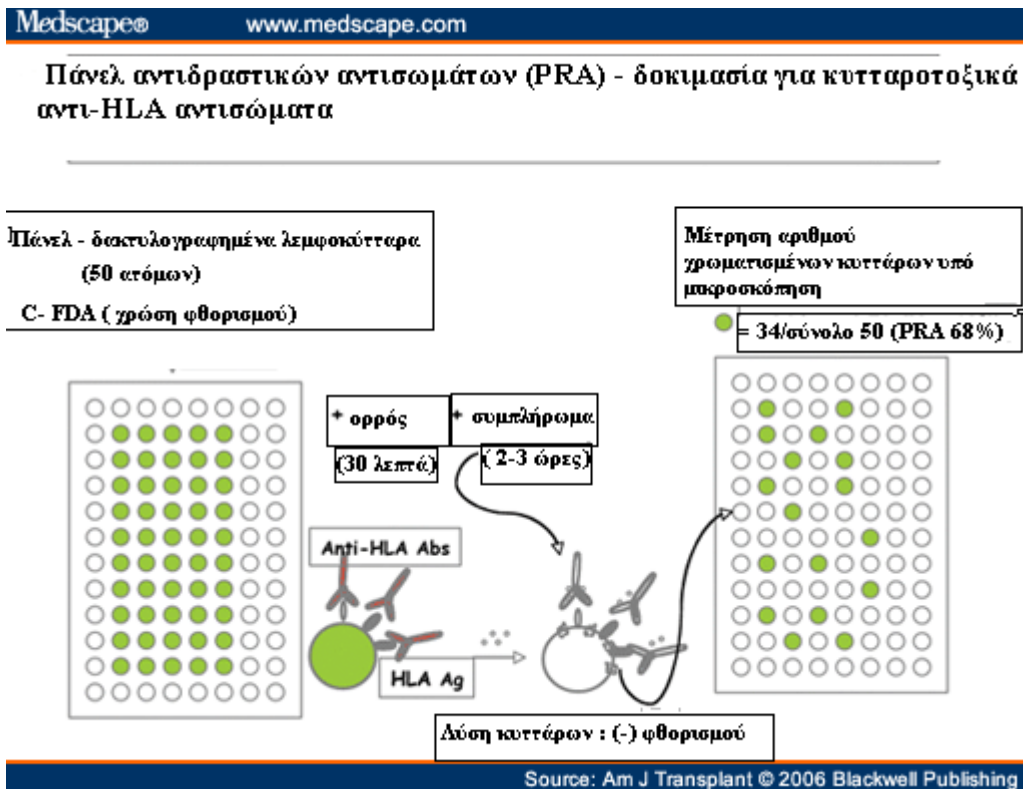
A = Αριθμός κυττάρων με το αντιγόνο και θετικά με τον ορό

B = Αριθμός κυττάρων με το αντιγόνο αλλά είναι αρνητικά (ψευδή αρνητικά)

C = Αριθμός κυττάρων χωρίς το αντιγόνο αλλά είναι θετικά (ψευδή θετικά)

D = Αριθμός κυττάρων χωρίς το αντιγόνο και αρνητικά με τον ορό

Σημείωση: Ορός με τιμή  $r \geq 0,85$  ή μεγαλύτερη αποτελεί δυνητικά χρήσιμο αντιδραστήριο κατάταξης (<http://www.onelambda.com>).



Εικόνα 10: % PRA'S, καθορίζει σε τι ποσοστό αντιδρά ο ορός του ασθενούς σε ένα panel μορίων-στόχων ή κυττάρων (Ανατύπωση από [http://www.medscape.com/viewarticle/523523\\_2](http://www.medscape.com/viewarticle/523523_2))

### 3.2.2. Δοκιμασίες στερεής φάσης

Οι δοκιμασίες στερεής φάσης χρησιμοποιούν διαλυτοποιημένα ή ανασυνδυασμένα HLA τάξης I και II μόρια, τα οποία ακινητοποιούνται σε στερεή φάση (π.χ. πλάκες από πλαστικό ή σφαιρίδια από latex) και στη συνέχεια τα κυκλοφορούντα αντισώματα ανιχνεύονται με αυτοματοποιημένες μεθόδους οπτικής ανίχνευσης (κυτταρομετρία ροής ή φωτομετρικά). Οι δοκιμασίες αυτές προσφέρουν σημαντικά αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα, με αποτέλεσμα να έχουν αντικαταστήσει τις κυτταρικές δοκιμασίες σε πολλά εργαστήρια Ισοσυμβατότητας.

Η ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) είναι η πρώτη μέθοδος στερεής φάσης που αναπτύχθηκε το 1995. Είναι μία αντικειμενική, ημιποσοτική μέθοδος, η οποία συνήθως έχει σχεδιασθεί να ανιχνεύει IgG αντισώματα αν και μπορεί να ανιχνεύσει (με μία μικρή τροποποίηση) και IgM αντισώματα. Έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από την CDC και ανιχνεύει αντισώματα μη συνδέοντα το συμπλήρωμα, τα οποία φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στην έκβαση της μεταμόσχευσης. Αν και έχει σχεδιασθεί να ανιχνεύει μόνο ειδικά αντι-HLA αντισώματα, μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα ή με αντικαρδιολιπινικά αντισώματα .

Οι δοκιμασίες στερεής φάσης που βασίζονται στην κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιούν μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με κεκαθαρμένα HLA τάξης I και II αντιγόνα. Όπως και η ELISA, η μέθοδος ανιχνεύει συνήθως IgG αντισώματα, αν και μπορεί να ανιχνεύσει και άλλες τάξεις ανοσοσφαιρινών (Rath, 2013).

Πρόσφατα αναπτύχθηκε η τεχνολογία Luminex, που χρησιμοποιεί επίσης ένα μίγμα (pool) από HLA τάξης I και II αντιγόνα, προσδεδεμένα σε μικροσφαιρίδια (beads), τα οποία είναι σημασμένα με δύο χρωστικές σε διαφορετικές αναλογίες σε κάθε set σφαιριδίων. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να ταυτοποιηθούν αντισώματα έναντι όλων των HLA γενετικών τόπων (A, B,Cw, DRB1, DQB1, DQA1, DPB1). Η μέθοδος αυτή είναι πιο ευαίσθητη και ειδική από την ELISA και την CDC (Worsley et al. 2012). Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ανάπτυξη ανασυνδυασμένων HLA τάξης I και II κεκαθαρμένων αντιγόνων από κυτταρικές σειρές, τα οποία προσδένονται στα μικροσφαιρίδια (solid phase single-antigens detection systems-SPADS) και επιτρέπουν τον καθορισμό της ειδικότητας των αντι-

HLA αντισωμάτων με μεγάλη ακρίβεια, ακόμα και σε πολυευαισθητοποιημένους ασθενείς. Για τους παραπάνω λόγους, η τεχνολογία Luminox με χρήση μικροσφαιριδίων θεωρείται σήμερα η καλύτερη μέθοδος ταυτοποίησης των αντι-HLA DSA αντισωμάτων σε πολλά μεταμοσχευτικά κέντρα. Μολονότι το διαθέσιμο σήμερα πανελ των single-antigens μπορεί να ταυτοποιήσει αντισώματα έναντι όλων των γνωστών HLA αντιγόνων (περίπου 150), δεν καλύπτει όλο το φασμάτων HLA αλληλίων (>1500) και επομένως μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, λόγω μη ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι σπανίων αλληλίων, ιδιαίτερα σε πληθυσμούς με διαφορετικές εθνότητες ή μειονότητες. Από την άλλη, μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα, που οφείλονται στη μετουσίωση των HLA αντιγόνων προκειμένου να συνδεθούν στα μικροσφαιρίδια, με συνέπεια την αποκάλυψη νέων αντιγονικών επιτόπων, οι οποίοι δεν υπάρχουν στα φυσικώς διαμορφωμένα HLA μόρια (Rath, 2013).

### **3.3. Δοκιμασία Διασταύρωσης ( crossmatch) στη Μεταμόσχευση Νεφρού**

Η δοκιμασία διασταύρωσης (crossmatch) είναι απαραίτητη εργαστηριακή δοκιμασία πριν από τη μεταμόσχευση. Η εισαγωγή στην καθημερινή κλινική πράξη των μεθόδων διασταύρωσης από τους Patel και Terasaki και ο αποκλεισμός υποψηφίων ληπτών οι οποίοι παρουσίαζαν θετική δοκιμασία crossmatch, μείωσαν δραματικά τα επεισόδια υπεροξείας απόρριψης (Brain D et al, 2009).

Με την μέθοδο αυτή ελέγχεται η παρουσία προσχηματισμένων αντισωμάτων (έχουν συσχετισθεί με επεισόδια υπεροξείας απόρριψης, απώλεια και πτωχή επιβίωση του μοσχεύματος) έναντι των HLA τάξης I και II αντιγόνων του δότη (Salvalaggio et al. 2009). Αρχικά, τα ειδικά έναντι του δότη αντισώματα (DSA – donor-specific antibodies) ανιχνεύθηκαν με την κλασική δοκιμασία διασταύρωσης [complement dependent cytotoxicity (anti-human globulin augmented) with microscopy assessment–AHG-CDC), ενώ αργότερα, η πιο ευαίσθητη δοκιμασία διασταύρωσης με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry crossmatch with anti human globulin serum–FC-AHG) έγινε η δοκιμασία εκλογής για την ανίχνευση των αντι-HLA DSA αντισωμάτων σε πολλά μεταμοσχευτικά κέντρα (Brian D. et al. 2009, Graff et al. 2010). Πρόσφατα, με την καθιέρωση των τεχνικών στερεής φάσης, που

χρησιμοποιούν μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με ανασυνδυασμένα single-HLA αντιγόνα από κυτταρικές σειρές (τεχνολογία Luminex), κατέστη δυνατόν να ανιχνευθεί «εικονικά» η παρουσία αντι-HLA DSA αντισωμάτων, συγκρίνοντας τις ειδικότητες των αντι-HLA αντισωμάτων του λήπτη με την HLA τυποποίηση του δότη (Brain D et al. 2009).

Παρολαυτά, πρέπει να τονιστεί ότι ο τύπος του crossmatch που εφαρμόζεται και τα κριτήρια για την απόδειξη ενός θετικού αποτελέσματος διαφέρουν μεταξύ των ανοσολογικών εργαστηρίων και κρίνεται σκόπιμη η συνεχής επαφή και συνεργασία των μεταμοσχευτικών κέντρων και των εργαστηρίων ιστοσυμβατότητας. Η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων, αποτελεί το συχνότερο αίτιο ψευδώς θετικού crossmatch και θα πρέπει να αναγνωρίζεται έγκαιρα. Στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων πάντως, η ανίχνευση ενός θετικού crossmatch υποδηλώνει την παρουσία IgG αντισωμάτων έναντι HLA αντιγόνων τάξης I του δυνητικού δότη και αποτελεί αντένδειξη για μεταμόσχευση του οργάνου.

Στους υπερευαισθητοποιημένους ασθενείς πραγματοποιείται ένα εικονικό crossmatch, όταν ο πτωματικός δότης φέρει τα HLA αντιγόνα, τα οποία ανιχνεύθηκαν τα αντισώματα στον ορό του πιθανού λήπτη αυτός κρίνεται ακατάλληλος χωρίς τη διενέργεια αληθούς crossmatch (Krishnan et al. 2012).

Στις μεταμοσχεύσεις από ζώντα δότη, η δοκιμασία διασταύρωσης πραγματοποιείται κατά τον έλεγχο καταλληλότητας του δότη και επαναλαμβάνεται αμέσως πριν από την επέμβαση. Αντίθετα στις πτωματικές μεταμοσχεύσεις, η δοκιμασία διασταύρωσης εκτελείται αμέσως πριν από την επέμβαση, κατά τη φάση επιλογής των κατάλληλων ληπτών για ένα προσφερόμενο μόσχευμα (<http://www.ashi-hla.org/>).

### **3.3.1. Τεχνική Crossmatch**

#### **A. Απομόνωση και μέτρηση των λεμφοκυττάρων του δότη**

1. Λαμβάνεται 20 ml αίματος του δότη σε ηπαρινισμένο σωληνάριο (0.1 ml στα 10 ml αίματος).
2. Επιστίβαση του αίματος σε Ficoll- Hypaque.
3. Φυγοκέντρηση για 20 min σε 4000 στροφές.



4. Συλλογή της στοιβάδας των λεμφοκυττάρων και προσθήκη του διαλύματος RPMI 1640 (χωρίς γλουταμίνη) με ορό AB pool (εμπορίου, σε αναλογία μερών 4:1).
5. Πλύση των κυττάρων δύο φορές με διάλυμα RPMI+AB, έπειτα φυγοκεντρούμε για 5 min στις 5000 στροφές.
6. Επαναιώρηση των λεμφοκυττάρων και μέτρηση στον αιματολογικό αναλυτή (Cell-Dyn 4000 Abbott)

B. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα με εκτίμηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

Complement dependent cytotoxicity (anti-human augment) with microscopy assessment (AHG-CDC).

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση αντιγόνου - αντισώματος που παρατηρείται κατά την ανάμειξη του ορού του λήπτη με κύτταρα του δότη παρουσία συμπληρώματος κονίκλου. Η κυτταροτοξικότητα ανιχνεύεται μέσω χρώσης των επωασμένων κυττάρων δότη με τον ορό του λήπτη με Eosin. Η χρωστική διαπερνά την αλλοιωμένη μεμβράνη και χρωματίζει το νεκρό κύτταρο. Αναλυτικότερα, η μεθόδος έχει ως εξής:

1. Επίστρωση 2000-3000 ανά κκχ κυττάρων με σύριγγα Hamilton σε πλάκα Terasaki (1μl εναιωρήματος σε κάθε θέση της πλάκας).
2. Επώαση των κυττάρων του δότη με 1 μl ορού του λήπτη σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
3. Επώαση των κυττάρων του λήπτη με 1 μl ορού του λήπτη σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min (δοκιμασία αυτοδιασταύρωσης).
4. Πλύση των κυττάρων με RPMI+AB.
5. Προσθήκη 5μl συμπληρώματος κονίκλου σε κάθε θέση και επώαση για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Απομάκρυνση της περίσσειας του συμπληρώματος με δυνατό τίναγμα της πλάκας.
7. Προσθήκη της χρωστικής Eosin.

8. Ανάγνωση σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Η βαθμολογία των αντιδράσεων γίνεται όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 8: Αναγνώριση των αποτελεσμάτων, (Ανατύπωση από Leffell and Bray, 2001 )

SCORE	ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΑ	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
0		Δεν διαβάζεται
1	0-10%	Αρνητικό
2	11-20%	Αμφίβολο
4	21-50%	Ασθενές θετικό
6	51-80%	θετικό
8	81-100%	Έντονα θετικό

Γ. Κυτταρομετρική δοκιμασία διασταύρωσης με αντισφαιρινικό ορό.

Flow cytometry crossmatch with anti-human globulin serum (FC-AHG)

Η μέθοδος στηρίζεται στη χρησιμοποίηση φθορίζοντος αντισώματος έναντι της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης (IgG ή IgM) των αντι-HLA αντισωμάτων. Σε συνδυασμό χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα που χαρακτηρίζουν το είδος των λεμφοκυττάρων (CD3 για τα T και CD19 για τα B λεμφοκύτταρα). Η θετικότητα μετράται με την σχέση των φθορισμών των IgG και IgM επί των T και B-λεμφοκυττάρων στο εξεταζόμενο δείγμα, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Αυτή αξιολογείται:

- α) με την διαφορά των διαμέσων τιμών των καναλιών ή
- β) με τον λόγο των διαμέσων τιμών των καναλιών ή των πραγματικών τιμών (μετά από απολογαριθμοποίηση).

Αναλυτικά, η μέθοδος έχει ως εξής:

1. Τοποθέτηση ποσότητας 100.000 λεμφοκυττάρων δότη με σωληνάρια 12X75 mm.
2. Επώαση με 2% fetal calf serum (FCS) σε PBS στους 37°C για 20 min.

3. Φυγοκέντρωση για 5 min στις 4000 στροφές.
4. Προσθήκη 50 μl ορού και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Τρεις πλύσεις με PBS για 5 min στις 4000 στροφές.
6. Προσθήκη 10 μl μονοκλωνικού anti-(Fab)2 IgG-FITC και IgM-FITC (Jackson Immunoresearch) με τίτλο 1:8, καθώς επίσης και το μονοκλωνικό CD3-PE (DAKO) και CD19-PECY5 (DAKO) σε ποσότητα 10 μl.
7. Επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Τρεις πλύσεις με PBS για 5 min σε 4000 στροφές.
9. Επαναιώρηση σε 500 μl PBS και ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής Ortho Cytoron (Ortho Diagnostics) (Leffell and Bray, 2001).

#### 4. Μεταμοσχευτικός έλεγχος

Θεμελιακό στοιχείο της Ανοσολογίας της μεταμόσχευσης αποτελεί η αναγνώριση των αντιγόνων του μοσχεύματος (αλλοαντιγόνα) από το ανοσιακό σύστημα του λήπτη, ως ξένων για τον οργανισμό του και η κινητοποίηση, ως εκ τούτου, διεργασιών, οι οποίες αποσκοπούν στην αποβολή (απόρριψη) του μοσχεύματος. Η απόρριψη του μοσχεύματος είναι ένα πολυσύνθετο φαινόμενο, που συσχετίζεται με τη βλάβη από ισχαιμία-επαναιμάτωση, τον κυτταρικό τραυματισμό, την επαγωγή των μορίων προσκόλλησης και την εισροή κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Fuggle & Koo, 1998). Η αυξημένη απελευθέρωση των αποδιαταγμένων αιμοπρωτεϊνών, που προέρχονται από τα τραυματισμένα κύτταρα, είναι πρωταρχικής σημασίας για την έναρξη, αλλά και την εξέλιξη της φλεγμονής, που ενεργοποιείται κατά την απόρριψη του μοσχεύματος.

Η απόρριψη ή η βλάβη του μοσχεύματος, μπορεί τεχνητά να διαιρεθεί σε τρεις φάσεις. Αρχικά, υπάρχει βλάβη στο όργανο ή στα κύτταρα, η οποία συμβαίνει κατά τη διαδικασία λήψης του οργάνου, τη συντήρησή του στο διάλυμα συντήρησης, και στη συνέχεια κατά την επαναιμάτωση του στο λήπτη. Η πρώτη αυτή φάση αναφέρεται και ως σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (υπεροξεία απόρριψη). Η δεύτερη φάση είναι η οξεία απόρριψη, η οποία πραγματοποιείται κατά τους πρώτους 6 μήνες από τη μεταμόσχευση και συμβαίνει κατά κύριο λόγο με τη διαμεσολάβηση των T-λεμφοκυττάρων (Wecker & Auchincloss 1992, Strom et al. 1996). Σε αυτόν τον τομέα της μεταμόσχευσης, έχει πραγματοποιηθεί η μεγαλύτερη πρόοδος, χάρη στην ανακάλυψη των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Η τρίτη φάση, που αποτελεί και τη συνηθέστερη αιτία απώλειας του οργάνου, είναι η χρόνια απόρριψη, η οποία αναφέρεται και ως συσχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση αρτηριοσκλήρυνση. Η διαδικασία αυτή διαρκεί από μήνες έως και χρόνια και συχνά συνυπάρχει με την οξεία απόρριψη. Υπάρχουν πολλοί πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες που οδηγούν στη χρόνια απόρριψη.

Όπως συμβαίνει και σε άλλες «ανοσολογικές καταστάσεις», συμπεριλαμβάνεται η ταυτόχρονη καταστροφή των κυττάρων του μοσχεύματος τόσο από T-λεμφοκύτταρα, όσο και από αντισώματα, παρόλο που η γενική φλεγμονή από

άλλα αίτια, ανήκουν επίσης στη λίστα των δυνητικών παραγόντων, που είναι υπεύθυνα για τη σταδιακή διαδικασία της απόρριψης.

Τα τελευταία χρόνια έγινε μια προσπάθεια στη ταξινόμηση κατά Banff<sup>8</sup> για μια ενιαία αξιολόγηση των παθολογοανατομικών ευρημάτων και ελήφθησαν υπόψη και παθογενετικοί παράγοντες (Solez K, 2012).

#### **4.1. Υπεροξεία απόρριψη**

Η υπεροξεία απόρριψη χαρακτηρίζεται από ταχύτατη θρόμβωση του αγγειακού δικτύου του μοσχεύματος, που εμφανίζεται μέσα σε λίγα λεπτά από τη στιγμή της αναστόμωσης των αιμοφόρων αγγείων του με εκείνα του δότη και πριν από την εκδήλωση της φλεγμονής. Παρατηρείται σπάνια λόγω βελτίωσης των τεχνικών ιστοσυμβατότητας. Παθολογοανατομικά, εντός των αγγείων του μοσχεύματος, παρατηρείται μεγάλος αριθμός πολυμορφοπυρήνων, διάχυτοι μικροθρόμβοι και συνάθροιση αιμοπεταλίων. Η παρουσία αιμορραγίας υποδηλώνει

---

<sup>8</sup> Banff: η ταξινόμηση των αλλοιώσεων της βιοψίας του μοσχεύματος, έχει προκύψει σε μια συνάντηση στο Banff του Καναδά, που πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά στις 2-4 Αύγουστου του 1991, από την επιτροπή της Διεθνούς Νεφρολογικής Εταιρίας. Οι αλλοιώσεις της βιοψίας νεφρικού μοσχεύματος έχουν υποστεί μέχρι σήμερα σειρά αναθεωρήσεων και τροποποιήσεων. Οι σημαντικότερες ήταν αυτές του 1999, στην οποία διαχωρίστηκε η κατηγορία της ενδαρτηρίτιδας, του 2003, στην οποία προστέθηκε η αντισωματική απόρριψη και η τελευταία, του 2005, στην οποία αναγνωρίστηκε η οντότητα της χρόνιας ενεργού αντισωματικής απόρριψης και εξαλείφθηκε ο ασαφής όρος «χρόνια νεφροπάθεια μοσχεύματος». Η ταξινόμηση κατά Banff λαμβάνει υπόψη στην οξεία απόρριψη το βαθμό διήθησης του διάμεσου ιστού (interstitial infiltration), το βαθμό σωληναρίτιδας (tubulitis) και της προσβολής των αρτηριδίων [αρτηρίτιδα (arteritis) έσω χιτώνα ή διατοιχωματική] καθορίζοντας τρεις τύπους (I-III) με αυξανόμενη βαρύτητα. Αναφορικά με τη χρόνια απόρριψη, η ταξινόμηση λαμβάνει υπόψη το βαθμό διάμεσης ίνωσης (interstitial fibrosis) και το βαθμό σωληναριακής ατροφίας (tubular atrophy) καθορίζοντας τρεις βαθμούς βαρύτητας και εδώ, δηλαδή μικρό, μέτριο και σοβαρό (Racusen et al. 1999, Halloran. 2002).

την καταστροφή του αγγειακού τοιχώματος, ενώ σπάνια υπάρχει διάμεση λευκοκυτταρική διήθηση (Γερμένης, 2000).

Τα αντισώματα που μεσολαβούν στην εκδήλωση της υπεροξείας απόρριψης, είναι φυσικά αντισώματα, τα οποία στρέφονται έναντι πολυμορφικών πρωτεϊνών, οι οποίες εκφράζονται στο ενδοθήλιο του μοσχεύματος. Παράγοντες κινδύνου για υπεροξεία απόρριψη είναι ο υψηλός δείκτης κυτταροτοξικών αντισωμάτων, το θετικό crossmatch και η ABO ασυμβατότητα μεταξύ λήπτη και δότη (Brian J. et al. 2003).

## **4.2. Οξεία απόρριψη**

Η οξεία (κυτταρική) απόρριψη χαρακτηρίζεται από νέκρωση των παρεγχυματικών κυττάρων που, κατά κανόνα, συνοδεύεται από λευκοκυτταρική διήθηση του διάμεσου ιστού του μοσχεύματος. Τα λευκοκύτταρα που επικρατούν, είναι μακροφάγα και T-κύτταρα (CD4+ και CD8+), στον ίδιο περίπου βαθμό, ενώ τα πολυμορφοπύρρηνα, απουσία λοιμώξεως, είναι σπάνια (Γερμένης, 2000). Η βαρύτητα και ο χρόνος εμφάνισης των επεισοδίων της οξείας απόρριψης παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της χρόνιας απόρριψης, καθώς φαίνεται ότι τα απώτερα (> 3 μήνες) και αυτά που συνοδεύονται από αγγειακές αλλοιώσεις συνδέονται με πτωχότερη επιβίωση του νεφρικού μοσχεύματος (Brian J. et al. 2003).

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της βλάβης του νεφρικού μοσχεύματος λόγω οξείας απόρριψης ποικίλουν. Μη αναστρέψιμη απώλεια νεφρώνων η οποία ακολουθείται από σπειραματική υπερδιήθηση και υπέρταση οδηγεί σε φαύλο κύκλο ανεπάρκειας του νεφρικού μοσχεύματος. Επίσης, σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα τα οποία προσβάλλονται από T-λεμφοκύτταρα παράγουν IL-15, η οποία αποτελεί παράγοντα πολλαπλασιασμού ειδικών CD8+ (κυτταροτοξικών) T-λεμφοκυττάρων μέσω των οποίων επέρχονται διαταραχές του διαμεσοσωληναριακού χώρου, διάμεση ίνωση και σε μακροχρόνια βάση δυσλειτουργία του νεφρικού μοσχεύματος. Η βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων ταυτόχρονα με την παρουσία και άλλων παραγόντων, όπως υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης και CMV λοίμωξη, μπορεί να

οδηγήσει σε πλήρη απόφραξη του αυλού των αρτηριών του μοσχεύματος. Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερη σημασία αποκτά η υποκλινική απόρριψη ως υπεύθυνη για την εμφάνιση της χρόνιας νεφροπάθειας του μοσχεύματος και αποτελεί έναν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα μειωμένης επιβίωσης του μοσχεύματος (Rush, 2004).

### **4.3. Χρόνια απόρριψη**

Η χρόνια απόρριψη χαρακτηρίζεται από προοδευτική αγγειακή απόφραξη από νεοσχηματιζόμενο έσω χιτώνα (intima) στις μεγάλου και μέσου διαμετρήματος αρτηρίες και, σε μικρότερο βαθμό, στις φλέβες του μοσχεύματος. Ο νεοσχηματιζόμενος έσω χιτώνας περιέχει, μεταξύ των άλλων, λεία μυϊκά κύτταρα και μεγάλη ποσότητα εξωκυττάριας ουσίας. Τις αγγειακές αλλοιώσεις συχνά συνοδεύει σημαντικού βαθμού διάμεση ίνωση, ενώ η λευκοκυτταρική διήθηση είναι συνήθως περιορισμένη ή και απύση. Η παθογένεια της χρόνιας απόρριψης είναι πολύ λιγότερο διευκρινισμένη από εκείνη των άλλων μορφών απόρριψης. Έχει εκφραστεί η άποψη ότι η ίνωση της χρόνιας απόρριψης αντιπροσωπεύει διαδικασία επούλωσης, που ακολουθεί την κυτταρική νέκρωση των επεισοδίων της οξείας απόρριψης. Σε πολλές περιπτώσεις, όμως, η χρόνια απόρριψη εμφανίζεται χωρίς να έχουν προϋπάρξει ενδείξεις οξείας απόρριψης (Γερμένης, 2000).

Ο παλιότερος όρος χρόνια απόρριψη έχει αντικατασταθεί από τον όρο χρόνια νεφροπάθεια του μοσχεύματος (Solez et al. 2007). Σημαντικό ρόλο στην έκπτωση της λειτουργίας του νεφρικού μοσχεύματος διαδραματίζουν τόσο ανοσολογικοί όσο και μη ανοσολογικοί παράγοντες κινδύνου (πίνακας 8). Οι παράγοντες αυτοί, αν και διακρίνονται μεταξύ τους, συχνά συνυπάρχουν και δρουν ταυτόχρονα στην πρόοδο της βλάβης του μοσχεύματος.

Πίνακας 8: Παράγοντες κινδύνου χρόνιας νεφροπάθειας μοσχεύματος (Ανατύπωση από Solez et al. 2007)

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΜΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
<ul style="list-style-type: none"> <li>• HLA ασυμβατότητα</li> <li>• Αντι- HLA αντισώματα</li> <li>• Υποκλινική απόρριψη</li> <li>• Οξεία απόρριψη</li> <li>• Ανεπαρκής ανοσοκαταστολή</li> <li>• "Ευαισθητοίηση" του λήπτη</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ηλικία του δότη</li> <li>• Συνοδός νοσηρότητα δότη/λήπτη</li> <li>• Προέλευση του μοσχεύματος</li> <li>• Ηλικία του λήπτη</li> <li>• Βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης</li> <li>• Νεφρική μάζα και Δείκτης μάζας σώματος (BMI)</li> <li>• CMV λοίμωξη</li> <li>• Υπερλιπιδαιμία</li> <li>• Υπέρταση</li> <li>• Καθυστερημένη λειτουργία μοσχεύματος</li> </ul>

Αν και η επίπτωση της HLA συμβατότητας στην ΧΝΝ έχει μειωθεί τα τελευταία χρόνια λόγω της προόδου της ανοσοκατασταλτικής θεραπείας, εντούτοις από την ανάλυση των μεγάλων εθνικών αρχείων, που βασίζονται σε δεκάδες χιλιάδες μοσχεύματα, έχει καταγραφεί σταδιακή μείωση της επιβίωσης του μοσχεύματος και του χρόνου ημίσειας ζωής, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των HLA ασυμβατοτήτων. Η σημασία της ιστοσυμβατότητας γίνεται αρκετά εμφανής όταν υπάρχει μηδενική διαφορά αντιγόνων ιστοσυμβατότητας μεταξύ δότη και λήπτη (Brian J. et al. 2003).



## 5. Προβληματισμοί – Προοπτικές

Ο εμπειριστατωμένος προμεταμοσχευτικός έλεγχος των ασθενών που αναμένουν μεταμόσχευση, η κατάλληλη φαρμακευτική ανοσοκαταστολή, καθώς και ο ανοσολογικός έλεγχος μετά την μεταμόσχευση δεν επιτυγχάνουν τελικά το ποθητό αποτέλεσμα, δηλαδή τη δια βίου λειτουργία του αλλομοσχεύματος.

Η αναγνώριση των αντιγόνων του μοσχεύματος από το ανοσιακό σύστημα του λήπτη έχει ως αποτέλεσμα την κινητοποίηση του μηχανισμού απόρριψης του μοσχεύματος. Τα T-λεμφοκύτταρα του λήπτη μπορούν να αναγνωρίζουν τα HLA αλλοαντιγόνα μέσω δυο διαφορετικών οδών. Σύμφωνα με την άμεση οδό (direct pathway), τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του δότη παρουσιάζουν τα HLA αντιγόνα του δότη κατευθείαν στον T κυτταρικό υποδοχέα (TCR) ενός T κυττάρου του λήπτη. Σύμφωνα με την έμμεση οδό (indirect) τα HLA μόρια του δότη αφού επεξεργαστούν παρουσιάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του λήπτη και αναγνωρίζονται με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο τα T-κύτταρα αναγνωρίζουν οποιοδήποτε αντιγόνο. Τα αλλοαντιγόνα που αποπίπτουν από το μόσχευμα εκλαμβάνονται από τα APC του λήπτη ως εξωγενή αντιγόνα (Ingulli, 2010).

## Περίληψη

Η μεταμόσχευση νεφρού αποτελεί θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Η προέλευση του δότη μπορεί να είναι α) από ζώντες συγγενείς (γονείς ή αδέρφια), β) από πτωματικούς δότες και γ) από ζώντες μη συγγενείς δότες (σύζυγοι). Η επιλογή του κατάλληλου δότη είναι ο θεμέλιος λίθος πάνω στον οποίο στηρίζεται, κατά κύριο λόγο, μια επιτυχημένη μεταμόσχευση. Κάθε ανοσολογική παράμετρος που συντελεί στην καλύτερη επιλογή του δότη-λήπτη αποτελεί αντικείμενο συνεχούς έρευνας. Ένας προσεκτικός προμεταμοσχευτικός εργαστηριακός έλεγχος του λήπτη περιλαμβάνει κυρίως τον έλεγχο ιστοσυμβατότητας, τον έλεγχο ευαισθητοποίησης του λήπτη και τον ιολογικό έλεγχο του δότη και του λήπτη.

Η ταυτότητα, μεταξύ λήπτη και δότη, ως προς τα αντιγόνα HLA, είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της μεταμόσχευσης, ιδίως σε HLA-A, HLA-B, HLA-DR γονιδιακές θέσεις. Αναλυτικότερα ο προμεταμοσχευτικός έλεγχος των HLA αντιγόνων περιλαμβάνει την ανίχνευση και τυποποίηση τους, τον έλεγχο αντισωμάτων και την δοκιμασία διασταύρωσης.

Τα αντιγόνα HLA τάξης I και II προσδιορίζονται στα T και B-κύτταρα αντίστοιχα, με ορολογικές (Complement Dependent Lymphocytotoxicity, CDC) και μοριακές (PCR-SSP και PCR-SSO) μεθόδους. Η ανίχνευση των HLA αντισωμάτων έναντι των HLA τάξης I και II αντιγόνων έχει συσχετιστεί με επεισόδια οξείας απόρριψης, απώλεια και πτωχή επιβίωση του μοσχεύματος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, μέχρι σήμερα, για την ανίχνευση των αντι-HLA αντισωμάτων βασίζονται στην αρχή της αντίδρασης τους με τα κύτταρα-στόχους παρουσία συμπληρώματος και σε μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με κεκαθαρμένα HLA I & II αντιγόνα. Η δοκιμασία διασταύρωσης (crossmatch) είναι απαραίτητη εργαστηριακή δοκιμασία πριν από τη μεταμόσχευση. Οι τύποι της απόρριψης νεφρικού μοσχεύματος καθορίζονται με βάση την παθολογοανατομική εικόνα και όχι με βάση τον παθογενετικό μηχανισμό. Ως εξέταση εκλογής για την διάγνωση της απόρριψης του νεφρικού μοσχεύματος παραμένει η νεφρική βιοψία.

## **Abstract**

Kidney transplant is used as a substitution treatment of renal function in patients with chronic end stage renal failure. The donors can be derived from a) living relatives (parents or siblings), b) deceased donors, and c) living non-relatives (spouse). The choice of the suitable donor is the keystone on which a successful transplant relies on. Every immune parameter that contributes to a better selection of donor-recipient, is the subject of ongoing research. The donor's careful pre-transplant laboratory testing includes, histocompatibility testing, recipient's sensitization testing and virus control of both donor and recipient.

The identification of HLA antigens, between the donor and the recipient, are of prime importance for transplant's success, especially in the HLA-A, H HLA-B, HLA-DR gene loci. More specifically, the pre-transplant HLA antigen testing includes their detection and typing, as well antibody testing and the crossmatch testing.

HLA class I and II antigens are identified in T-cells and B-cells, using serologic (Complement Dependent Lymphocytotoxicity - CDC) and molecular (PCR-SSP and PCR-SSO) assays. The identification of HLA antibodies against HLA class I and II antigens has been associated with acute rejection, loss and poor graft survival episodes. So far, the methods used for the detection of anti-HLA antibodies are based on the principle of their reaction with the target cells, in the presence of complement and microbeads coated with purified HLA I & II antigens. Crossmatch testing is an essential laboratory assay performed before the transplant. The types of renal transplant rejection are determined by histology and not according to the pathogenetic mechanism. However, biopsy remains the most useful testing of the renal graft rejection diagnosis.

## Βιβλιογραφία

- Alves C. Souza T. Meyer I. Betania M. Immunogenetics and Diseases: Special Referenve to the Mayor Histocompatibility Complex, The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 10(2):122-131,2006
- Bangham C. Methods in Molecular Biology, Vol 9 Protocols in Human Molecular Genetics, The Humana Press Inc, Clifton N.J., USA, 1991
- Benacerraf B. The role of MHC gene products in immune regulation and its relevance to alloreactivity, Physiology or Medicine, MA 02115,USA, 1980
- Bjorkman J. P. Parham P. Structure, Function and Diversity of Class I Major Histocompatibility Complex Molecules,Annual Reviews, 59:253-88, 1990
- Bodmer W.F. The HLA system: structure and function, Journal CLINICAL PATHOLOGY, 40:9, London, 1987
- Brian D. Tait, Fiona Hudson, Linda Cantwell et al. Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation, NEPHROLOGY, 14: 247-254, 2009
- Brian J. Nankivell, Richard J. Borrows et al. The Natural History of Chronic Allograft Nephropathy, The New England Journal of Medicine, 349:2326-33, 2003
- Bueger M.d. and Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens, Transplant Immunology, 1:28-38, 1993
- Choo Y.S., The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical, Testing and Clinical Implications, Yonsei Medical Journal, 48:1, 11-23, New York, 2007
- Dausset J. Iso-leuco-anticorps, Acta Haematology, 20:156-156, 1958
- Fuggle S. V. & Koo D. D. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation, Transplantation (Baltim), 65: 763–769, 1998
- Garscia M.A. YebraB.G., Flores A.L. and Guerra, The Major Histocompatibility Complex in Transplantation, Editor: Niels Olsen Saraiva Camara, article: 8421141, 2012
- Gebel H.M., Bray R.A. and Nickerson P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA- Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk, American Journal of Transplantation, 3:1488-1500, Copyright 2003
- Graff R.J. Buchanan P.M. Dzebisashvilli N et al. The Clinical Importance of Flow Cytometry Crossmatch in the Context of CDC Crossmatch Results, Transplantation Proceedings, 42:347-3474, 2010

- Halloran PF. Call for revolution: A New Approach to Describing Allograft Deterioration, American Journal of Transplantation, 2: 195-200, 2002
- Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation, Pediatr Nephrol, 25:611-74, 2010
- Krishnan N. S. Zehnder D. et al. Human leukocyte antigen antibody incompatible renal transplantation, Indian J Nephrol, 22(6): 409-214 , Dec 20012
- Laperrousaz S. Tiercy S. Villard J., Ferrari-Lacra S. HLA and non-HLA polymorphisms in renal transplantation, Swiss Medical Weekly, 2012
- Leffell M.S. and Bray R.A., Principles and Quality Assurance of Immunofluorescence and Flow Cytometry.In, ASHI Laboratory Manual, The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 4th edition, volume II, A.1-14, 2001
- Leffell M.S. Assessment of Purity and Viability by vital dyes, histochemistry and cytometry. In., ASHI Laboratory Manual ,4<sup>th</sup> edition, The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Lenexa, Vol I, IA. 12.1-12.8, 2001
- Levey A. S, Coresh J., Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification, National Kidney Foundation, Inc, New York 2002
- Mahdi BM. A glow of HLA typing organ transplantation, Clinical and Translation Medici, Vol 2 ,2013
- Maniatis T. Fritsch E.F. Smabrook J Molecular cloning, A laboratory Manual, Clod Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, 1982
- Mehra K. N. Histocompatibility Antigens, life of Sciences, Nature Publishing Group, 2001
- Middleton D and F. Williams, PCR-Sequence-Specific Oligonucleotide Probe Typing for HLA-A, -B, and -DR, Methods in molecular Biology, vol 210: MHC Protocols, 2002
- Mike Bunce, PCR-Sequence-Specific Primer Typing of HLA Class I and II Alles, Methods in molecular Biology, vol 210: MHC Protocols ,2002
- Rath Th. Current Issues and Future Direction in Kidney Transplantation, Publisher: InTech, Chapters published, 2013, ISBN 978-953-51-0985-3 Shyam Dheda, Siew Chong, Rebecca Lucy Williams. Detection of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation and the Management of Highly sensitized Kidney Transplant Recipients

- Salvalaggio Paolo R., Ralph J. Graff et al. Crossmatch Testing in Kidney Transplantation: Patterns of Practice and Associations with Rejection and Graft Survival, *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 20(4):577-589, 2009
- Perreault C. Decary F. Brochu S. Gyger M. Belanger and Roy D. Minor histocompatibility antigens, *American Society of Hematology*, 76:1269-1280, 1990
- Racusen Lc, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology, *Kidney International*, 55:713-723, 1999
- Rush D: Winnipeg Transplant Group, Insights into subclinical rejection, *Transplant Proc. Department of Medicine*, 36(2):71S-73S, 2004
- Saiki PK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988
- Saiki R. K. Scharf S., Faloona F. Mullis K. B., Horn G. T. Erlich H. A. Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230: 1350-1354, 1985
- Schiffer M. and Kielstein JT. ABO-incompatible renal transplantation: From saline flushes to antigen-specific immunoabsorption-Tools to overcome the barrier, *The Korean Journal of Hematology*, 46,3:164-168, 2011
- Shin M. and Kim S. J. ABO Incompatible Kidney Transplantation –Current Status and Uncertainties, *Journal of Transplantation*, 2011
- Solez K. Colvin R.B. Recusen L.C. Sis B. et al. Banff 05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy (CAN)», *American Journal of Transplantation*, 7:516-520, 2007
- Solez K. Lorraine C. Racusen, The Banff classification revisite, *Johns Hopkins Medical Institutions*, 83:201-206, USA 2012
- Strom T.B. Roy-Chaudhury P. Manfro R., Xheng X.X. Nickerson P.W. Wood K. Bushell A. The Th1/Th2 paradigm and the allograft response, *Current Opinion in Immunology*, 8(5): 688-693, 1996
- Southard J.H and Belzer F.O. Organ Preservation, *Annual Review of Medicine*, 46: 235-247, USA 1995
- Wecker H. & Auchincloss H. Cellular mechanisms of rejection, *Current Opinion in Immunology*, 4(5): 561-566. 1992
- West R, Burr G, Why families deny consent to organ donation, *Vincent's Hospital, Sydney*, 15(1): 27-32, 2002

- Worsley C. Mayne E., Suchard M. Luminex-based virtual crossmatching for renal transplantation in South Africa, South African Medical Journal January, 102:1, 2012, ISSN 003-802469
- Γερμενής Α. «Ιατρική Ανοσολογία», Παπαζήση ΑΕΒΕ, Αθήνα, 2000, ISBN 960-02-1397-6
- Τακούδας Δ, Παπανικολάου Β, Ίμβριος Γ. «Μεταμοσχεύσεις 2007 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΠΑΛΙΑ ΘΕΜΑΤΑ» ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2007
- Ταράση Α, «Έλεγχος ευαισθητοποίησης υποψηφίων ληπτών μοσχευμάτων: α) ειδικά έναντι του δότη αντισώματα (DSA) β) εικονική διασταύρωση (virtual XM), 15<sup>ο</sup> ΕΤΗΣΙΟ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ», ΑΘΗΝΑ 22-26 ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΥ 2010
- Vander A. Sherman J. Luciano D. Τσακόπουλος Μ. Φυσιολογία του Αθρώπου-Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού, Τόμος ΙΙ (8 έκδοση): Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2001
- McPhee S, Μουτσόπουλος Χ, Παθολογική Φυσιολογία, 2000
- <http://www.nobelprize.org>
- <http://www.ene.gr>
- <http://www.kidney.org>
- <http://www.eom.gr>
- <http://www.transplantation.gr>
- <http://www.ashi-hla.org>
- <http://www.onelambda.com>