

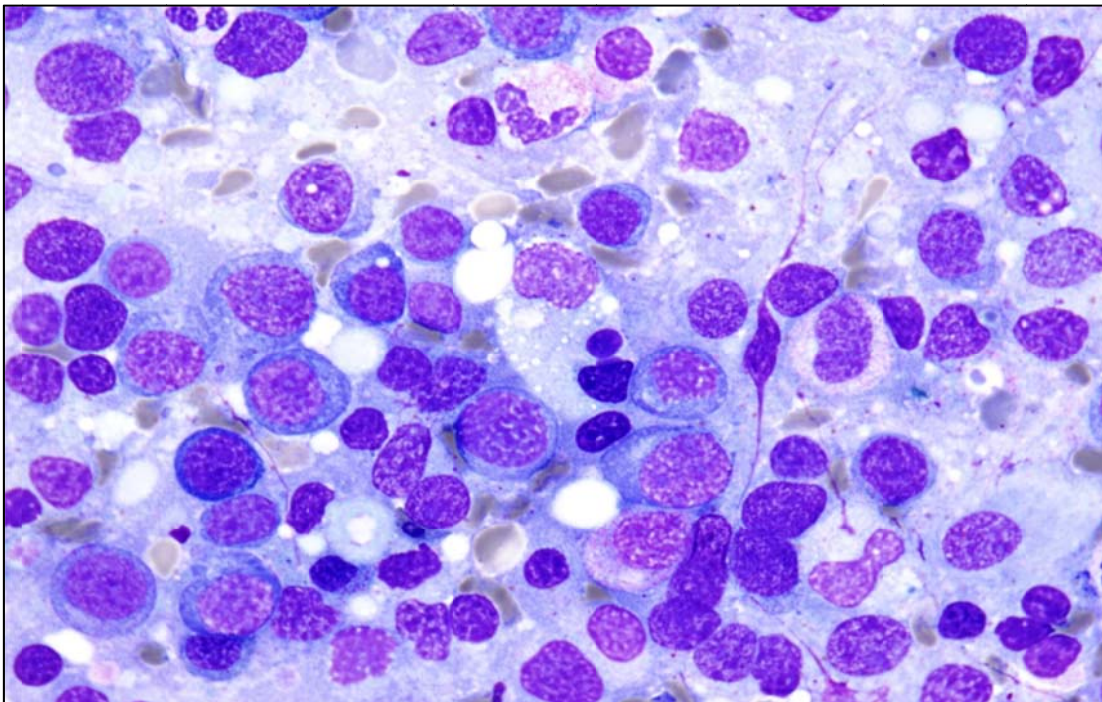
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ΠΡΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΤΙΚΟΣ**

**ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΗ**

**ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ**

**ΟΣΤΩΝ**



**Όνοματεπώνυμο φοιτητή: Παπαδοπούλου Αλεξία A.M.:08523**

**Όνοματεπώνυμο εισηγητή: Κριεμπάρδης Αναστάσιος,**

**Επίκουρος καθηγητής Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας**

## ΑΘΗΝΑ 2014

Λεζάντα εικόνας εξωφύλλου:

Μικροσκοπική Φωτογραφία Μυελού των Οστών

Ανατύπωση από:

[www.ucdmc.ucdavis.edu/pathology/education/residency\\_program/caseofthemonth/201012.html](http://www.ucdmc.ucdavis.edu/pathology/education/residency_program/caseofthemonth/201012.html)

*TECHNOLOGICAL EDUCATIONAL INSTITUTE (TEI) OF ATHENS*

*FACULTY OF HEALTH AND WELFARE*

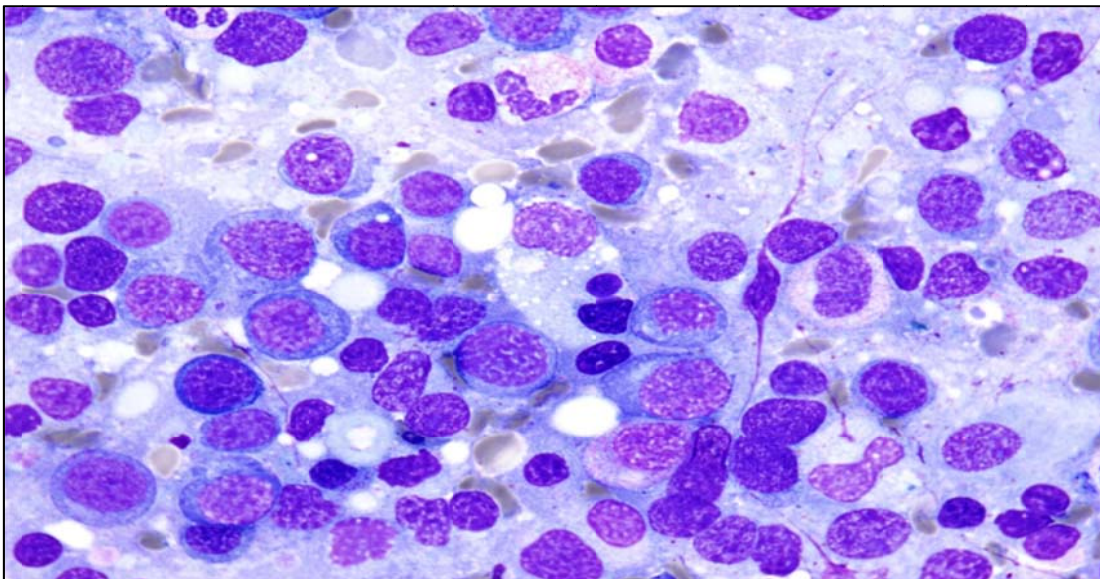
*DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES*

## **GRADUATION PROJECT**

### **PRE-TRANSPLANT IMMUNOLOGICAL**

### **CONTROL IN BONE MARROW**

### **TRANSPLANTATION**



*Student Name: Papadopoulou Alexia*

*Supervisor: Kriebardis Anastasios, Assistant Professor of laboratory Hematology  
and Transfusion Medicine*

**ATHENS 2014**



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>A. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ</b>	<b>01</b>
A.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ	01
A.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ	01
A.3. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ	07
A.4. ΑΝΤΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ	07
<b>B. ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ</b>	<b>08</b>
B.1. ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ- Εισαγωγή	08
B.2. ΑΒΟ ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ	09
B.3. ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ	12
B.3.1. ΤΟ ΗΛΑ ΣΥΣΤΗΜΑ	14
B.3.2. Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΣΙ	15
B.3.3. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ ΗΛΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	17
B.3.4. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΗΛΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΩΝ	18
B.3.4.1. Δομή των ΗΛΑ τάξης I μορίων	18
B.3.4.2. Δομή των ΗΛΑ τάξης II μορίων	21
B.3.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΗΛΑ ΜΟΡΙΩΝ	22
B.3.6. ΑΜΕΣΗ ΚΑΙ ΕΜΜΕΣΗ ΟΔΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΤΩΝ ΗΛΑ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ	23
B.3.6.1. ΠΩΣ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΕΜΠΟΔΙΣΟΥΝ ΜΙΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ	23
B.3.6.2. ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΗΛΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	24
B.4. ΕΛΑΣΣΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ	25
<b>Γ. ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ</b>	<b>25</b>
Γ.1. Ορισμός	25
Γ.2. Από ιστολογική άποψη	29
Γ.3. ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	34
Γ.3.1. Λευκοκύτταρα	34
Γ.3.2. Ερυθροκύτταρα	34
Γ.3.3. Αιμοπετάλια	
Γ.4. ΑΙΤΙΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	35
Γ.4.1. Οι διαταραχές	35
Γ.5. ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	37
Γ.5.1. Γενική αίματος	37
Γ.5.2. Αναρρόφηση/Βιοψία μυελού των οστών	38
Γ.5.3. Κυτταρομετρία ροής	39
Γ.5.4. Γενετικές εξετάσεις	39
Γ.5.5. Οσφυϊκή παρακέντηση	40

Γ.5.6. Μη-εργαστηριακές εξετάσεις	40
Γ.6. ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ	40
<b>Δ. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ</b>	<b>42</b>
Δ.1. Εισαγωγή	42
Δ.2. ΟΙ ΠΡΩΤΕΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	44
Δ.3. Η ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	45
Δ.4. ΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	45
Δ.5. Η ΜΟΝΑΔΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	46
Δ.6. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	48
Δ.7. Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	49
Δ.7.1 Αλλογενής μεταμόσχευση	50
Δ.7.1.1. Ενδείξεις	50
Δ.7.1.2. Προετοιμασία του ασθενούς	51
Δ.7.1.3. Λήψη και χορήγηση του μυελού	51
Δ.7.1.4. Επιπλοκές	52
Δ.7.2. Αυτόλογη μεταμόσχευση	52
Δ.7.2.1. Ενδείξεις	53
Δ.7.2.2. Προετοιμασία του ασθενούς	55
Δ.7.2.3. Λήψη και διατήρηση του μυελού	55
Δ.7.2.4. In vitro «κάθαρση» του μυελού	56
Δ.7.2.5. Επιπλοκές	57
Δ.8. Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΔΟΤΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	57
Δ.9. ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ	57
Δ.10. ΟΙ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ	58
Δ.11. Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ-GRAFT VERSUS HOST DISEASE	58
Δ.11.1. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ GRAFT VERSUS HOST DISEASE	61
Δ.11.2. ΤΑ ΜΕΤΡΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ GVHD	63
Δ.11.3. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	65
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>Ο ΠΡΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΤΙΚΟΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ</b>	<b>66</b>
<b>A.1. ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΠΡΙΝ ΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ</b>	<b>66</b>
<b>A.2. ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ</b>	<b>70</b>
<b>A.3. ΠΡΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΔΟΤΗ ΜΥΕΛΟΥ</b>	<b>70</b>
<b>A.4. Η ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ Εισαγωγή</b>	<b>71</b>
A.4.1. ΒΙΟΨΙΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΜΕ ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ	71
A.4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	72

A.4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	73
<b>B. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΗΛΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ</b>	<b>76</b>
B.1. ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΗΛΑ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ	78
B.1.1. Αρχή της μεθόδου	78
B.1.2. Τα στάδια της διαδικασίας	78
B.1.3. Αναλυτικά	79
B.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	87
B.2.1. PCR	88
B.2.2. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)	90
B.3. Τυποποίηση των ΗΛΑ τάξης II αλληλίων με την RFLP μέθοδο	93
B.4. Τυποποίηση των ΗΛΑ τάξης II αλληλίων με τη χρήση της PCR	94
B.5. Τυποποίηση των ΗΛΑ τάξης I αλληλίων με μοριακές τεχνικές	97
<b>Γ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙ-ΗΛΑ (κυτταροτοξικών) ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ</b>	<b>97</b>
<b>Γ.1. Γενικός έλεγχος</b>	<b>98</b>
Γ.1.1. ΠΡΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (Pretransplant Antibody Screen)- CDC	99
Γ.1.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ELISA	101
Γ.1.2.1. Αρχικά	101
Γ.1.2.2. Περιορισμοί μεθόδου	102
Γ.1.3. Η ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	104
Γ.1.4. ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗΣ (PRA %)	106
<b>Γ.2. Ειδικός έλεγχος (δοκιμασία διασταύρωσης)</b>	<b>106</b>
Γ.2.1. Η δοκιμασία ιστικής διασταύρωσης (HLA crossmatch)	107
Γ.2.2. Η FCXM	109
Γ.2.2.1. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα και πλεονεκτήματα της μεθόδου	109
<b>Δ.ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΠΡΟΒΑΘΜΙΔΩΝ</b>	<b>109</b>
Δ.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ	110
Δ.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	110
<b>Δ.3. ΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ-CD34</b>	<b>110</b>
Δ.3.1. Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ CD34	111
Δ.3.2. ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ CD34 <sup>+</sup> ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	112
Δ.3.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ CD34 <sup>+</sup> ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	113
<b>ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΕΠΙΤΕΥΞΕΙΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ</b>	
A. Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών χωρίς απόλυτη συμβατότητα	114
B. Αντικατάσταση ανοσοποιητικού συστήματος του λήπτη μοσχεύματος μέσω Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών	115

Γ. Η Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών ως θεραπεία στη νόσο του AIDS	116
Δ. Πρωτοποριακές εξελίξεις στη μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων	118
<b>Περίληψη</b>	<b>122</b>
<b>Abstract</b>	<b>124</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>128</b>



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## A. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

### A.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ

Η δυνατότητα αντικατάστασης ζωτικών οργάνων που εμφανίζουν τελικό στάδιο νόσου, με άλλα υγιή όργανα, αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες κατακτήσεις του αιώνα μας. Η ιστορία των μεταμοσχεύσεων ακολουθεί παράλληλα την ιατρική αντίληψη για την θεραπευτική αντιμετώπιση των διαφόρων νόσων, όπως αυτή εξελίχθηκε από την εποχή του Ιπποκράτη μέχρι την Αναγέννηση, που η επούλωση των τραυμάτων μπορούσε να θεωρηθεί μάλλον μαγικό φίλτρο, πάρα ιατρικό φαινόμενο.<sup>1,2,3</sup>

Από χειρουργική άποψη, η μεταμόσχευση δεν είναι παρά επιτυχής επαναγγείωση οργάνου ή ιστών και επομένως, ουσιαστικά, μεταμόσχευση σημαίνει επιτυχής επανασυρραφή αγγείων. Με αυτή την έννοια, δίκαια ο δεύτερος και τελευταίος χειρουργός που τιμήθηκε με το βραβείο Nobel, Alexis Carrel, δήλωνε το 1916, κατά την διάρκεια της τιμητικής διάλεξης και την βράβευσή του, ότι, «από χειρουργικής απόψεως, το πρόβλημα των μεταμοσχεύσεων έχει λυθεί». Είχε μόλις πετύχει την πρώτη επιτυχή αυτομεταμόσχευση νεφρού σε σκύλο, με απευθείας συρραφή των νεφρικών αγγείων.<sup>1,2,3</sup>

### A.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ

Κατά την περίοδο της αρχαιότητας στην Ελλάδα οι σημαντικότερες αναφορές στη μεταμόσχευση εμφανίζονται στο έργο του Γαληνού και στη συνέχεια η Ινδία όπου το 700π.Χ. στο κείμενο 'Suschouta Shamhita' περιγράφονται μεταμοσχεύσεις ιστών και αυτομεταμοσχεύσεις δέρματος. Στην Κίνα το 300π.Χ., σύμφωνα με κάποια γραπτά κείμενα που σώζονται μέχρι σήμερα, έγινε η πρώτη μεταμόσχευση καρδιάς από τον μυθικό ήρωα Pien Chiaο. Στην ορθόδοξη εκκλησία η πρώτη αναφορά χρονολογείται όταν ο Ιησούς Χριστός παρενέβη και επανασυγκόλλησε το δεξί αντί ενός υπηρέτη. Η εκκλησιαστική ιστορία της διδάσκει το θαύμα των Αγίων Πατέρων

και προστατών της ιατρικής, Κοσμά και Δαμιανού. Οι Άγιοι Κοσμάς και Δαμιανός που ήταν και γιατροί, μετά από κατανυκτική προσευχή ακρωτηριάσαν ένα κάτω άκρο που είχε προσβληθεί από κακοήγη όγκο και μεταμόσχευσαν στη μέση του ένα υγιές που πήραν από ένα Αιθίοπα ο οποίος είχε πεθάνει πρόσφατα (13ος αιώνας).<sup>1,2,3</sup>

Η ιατρική επιστήμη βράδυνε επί πολλούς αιώνες. Προσπάθειες για μεταμόσχευση ιστών έχουν γίνει από το μεγάλο Βρετανό ερευνητή J. Hunter (1771). Το 1804 ο Baronio απέδειξε, μετά από πειραματική προσπάθεια, ότι η ελεύθερη δερματική αυτομεταμόσχευση σε πρόβατα θα μπορούσε να είναι επιτυχής.<sup>1,2,3</sup>

Η αληθινή μεταμόσχευση οργάνων αρχίζει από τις αρχές του 19ου αιώνα. Στηρίχθηκε στη δυνατότητα αποκατάστασης της ροής του αίματος στο μόσχευμα μετά τη συρραφή και την αναστόμωση των αγγείων που εκτέλεσε ο Alexis Carrel το 1902. για τη θαυμάσιά του αυτή προσπάθεια ο μεγάλος Γάλλος ερευνητής κατέκτησε το βραβείο Nobel της Ιατρικής.<sup>1,2,3</sup>

Μετά την επίτευξη της αγγειοραφής τον ίδιο χρόνο οι Ullman και De Castello καθώς και ο Carrel στη Γαλλία, με τη συνεργασία του Guthrie το 1905 μεταμόσχευσε σε λαιμό σκύλου καρδιά που λειτούργησε αυτόματα για μία ώρα.<sup>1,2,3</sup>

Οι πρώτες γνωστές προσπάθειες για κλινική μεταμόσχευση νεφρού από πειραματόζωα σε άνθρωπο, με την εκτέλεση αγγειακών αναστομών, αναφέρθηκαν μεταξύ των ετών 1906-1923. Σαν μοσχεύματα χρησιμοποιήθηκαν νεφροί, προερχόμενοι από χοίρους και αίγες, από πιθήκους και πρόβατα. Βέβαια κανένα από αυτά τα μοσχεύματα δεν λειτούργησε και οι ασθενείς πέθαναν λίγες ώρες ή και 9 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση. Το 1933 με τη μέθοδο του Carrel, ο Mann μεταμόσχευσε σε πειραματόζωο καρδιά που διατηρήθηκε σε λειτουργία, με φυσιολογικό καρδιακό ρυθμό, για 8 ημέρες.<sup>1,2,3</sup>

Την πρώτη μεταμόσχευση νεφρού από άνθρωπο σε άνθρωπο πραγματοποίησε ο Ρώσος Voronoi το 1936. Ο ερευνητής μεταμόσχευσε νεφρό από πτωματικό δότη με ομάδα αίματος B (Rhesus +) σε λήπτη ομάδας O (Rhesus +). Μετά από 48 ώρες ο λήπτης πέθανε και ο θάνατος αποδόθηκε σε αντίδραση από την ασυμβατότητα των ομάδων του αίματος. Το έτος 1948 ανακοινώθηκε από τους Hufnagel, Hume και

Landsteiner μεταμόσχευση νεφρού από έναν άνδρα που μόλις είχε πεθάνει σε γυναίκα που βρισκόταν σε κωματώδη κατάσταση από οξεία σωληναριακή νέκρωση. Ο μεταμοσχευμένος νεφρός έπαψε να λειτουργεί μετά από 3 ημέρες, της δόθηκε όμως η ευκαιρία να ανανήψει και να επιβιώσει.<sup>1,2,3</sup>

Το Μάρτιο του 1951 στο νοσοκομείο Springfield της Μασαχουσέτης έγινε η πρώτη ορθοτοπική μεταμόσχευση νεφρού από τον James V. Scola. Ο χειρουργός της αναστόμωσε τα νεφρικά με τα σπληνικά αγγεία. Κατά την ίδια χρονική περίοδο αναφέρθηκαν προσπάθειες κλινικής μεταμόσχευσης νεφρού στο λαγόνιο βόθρο, από χειρουργούς της Γαλλικής Σχολής, τον Καθηγητή Kuss (1951), του Καθηγητές Dubost και Ν.Οικονόμου (1951), καθώς και τον Servelle (1951).<sup>1,2,3</sup>

Αμέσως μετά ανακοινώθηκαν διάφορες προσπάθειες μεταμόσχευσης νεφρού στο λαγόνιο βόθρο με αναστόμωση των νεφρικών με τα λαγόνια αγγεία, από τους Lawer (1951), Hume (1952), Michon (1953), Murray (1954), Joekes (1957) και Kraig (1960).<sup>1,2,3</sup>

Οι μεταμοσχεύσεις αυτές έγιναν χωρίς ανοσοκαταστολή και τα περισσότερα μοσχεύματα αποβλήθηκαν μέσα σε λίγες εβδομάδες, παρόλο που είχαν επιλυθεί τα περισσότερα εγχειρητικά προβλήματα.<sup>1,2,3</sup>

Πρώτος, από το 1924, ο Καθηγητής Πανεπιστημίου του Stanford της Καλιφόρνιας των ΗΠΑ, Hollman είχε υποστηρίξει την άποψη ότι η αντίδραση της απόρριψης είναι ένα "αφυλακτικό φαινόμενο". 20 χρόνια αργότερα ο Καθηγητής Medawar απέδειξε ότι η απόρριψη των μοσχευμάτων είναι αντίδραση ανοσίας. Ο ερευνητής με επανειλημμένες εργασίες κατά τα έτη 1944-58 καθώς και οι Billingham και Brent, έκαναν περισσότερο κατανοητό τον μηχανισμό της απόρριψης και επεσήμαναν την ανάγκη του φαινομένου αυτού.<sup>1,2,3</sup>

Πρώτος ο Joseph Murray το 1958 στο νοσοκομείο Peter Bend Brigham εφάρμοσε την ολική ακτινοβολία του σώματος σαν ανοσοκατασταλτική μέθοδο. Μέσα στα επόμενα χρόνια προστέθηκε το φάρμακο 6-mercaptopourine (Schwartz και Dameshik). Μέγιστη συμβολή στην αντιμετώπιση της απόρριψης αποτελεί η εφαρμογή της αζαθειοπρίνης (immuran) σαν ανοσοκατασταλτικού, την ισχυρή δράση του οποίου απέδειξε ο Καθηγητής του Πανεπιστημίου του Cambridge R.U.

Calne. Μεγαλύτερη ώθηση στον τομέα της ανοσοκαταστολής έδωσε η χρησιμοποίηση της κορτιζόνης που εφαρμόστηκε πειραματικά από τους Billingham, Krohn και Medawar(1951).<sup>1,2,3</sup>

Τα αποτελέσματα της εργασίας επαναβεβαιώθηκαν αργότερα από ερευνητές όπως: Morgan 1951, Cannon 1952, Sparrow 1953, Krohn 1954, Medawar 1956.<sup>1,2,3</sup>

Λίγο αργότερα άρχισε να εφαρμόζεται η ταυτόχρονη χορήγηση κορτικοστεροειδών και αζαθειοπρίνης σαν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (Hume 1963, Starzl 1963, Murray 1963), καθώς και η χορήγηση αζαθειοπρίνης και ακτινοβολίας (Woodruff 1963). Η πρώτη ετεροτοπική μεταμόσχευση ήπατος έγινε το 1955 από τον Welch. Λίγο αργότερα αναφέρθηκαν πειραματικές ορθοτοπικές μεταμοσχεύσεις ήπατος από τον ίδιο ερευνητή το 1956 και από τους Cannon (1956) και Moore (1959). Μεγάλη είναι η συμβολή στη μεταμόσχευση ήπατος του Αμερικανού Th. Starzl, ο οποίος το 1963 μετά από μακροχρόνιες πειραματικές προσπάθειες πραγματοποίησε την πρώτη κλινική ορθοτοπική μεταμόσχευση αυτού του οργάνου. Η πρώτη ετεροτοπική μεταμόσχευση ήπατος εφαρμόστηκε από τον Absolon το 1964.<sup>1,2,3</sup>

Οι πειραματικές προσπάθειες για τη μεταμόσχευση του παγκρέατος άρχισαν πολύ νωρίτερα από προσπάθειες για τη μεταμόσχευση ήπατος, αλλά προσέκρουσαν σε ανυπέβλητα τεχνικά προβλήματα. Πρώτοι οι Bauting και Best το 1922 χορήγησαν παγκρεατικά εκχυλίσματα χωρίς επιτυχία. Ακολούθησαν προσπάθειες για μεταμόσχευση τμημάτων παγκρέατος σε πειραματόζωα χωρίς την εκτέλεση αγγειακών αναστομών από τους Ivy-Farrel (1926) και Selle (1935). Πρώτοι οι Gayet και Guillaumie το 1927 καθώς και ο Houssay το 1929 ανέφεραν την εκτέλεση σε πειραματόζωα, μεταμοσχεύσεων παγκρέατος με αγγειακές αναστομές.<sup>1,2,3</sup>

Η πρώτη επιτυχής κλινική ετεροτοπική μεταμόσχευση παγκρέατος έγινε από τον Kelly το 1966, ο οποίος μεταμόσχευσε ταυτόχρονα νεφρό και πάγκρεας σε ασθενή με διαβητική νεφροπάθεια. Ο ερευνητής μεταμόσχευσε το σώμα και την ουρά του παγκρέατος εξωπεριτοναϊκά στο λαγόνιο βόθρο και αναστόμωσε τα λαγόνια αγγεία του λήπτη με την κοιλιακή αορτή και την πυλαία φλέβα του μοσχεύματος, αφού προηγουμένως απολίνωσε τον παγκρεατικό πόρο.

Η μεταμόσχευση των παραθυρεοειδών αδένων σε πειραματόζωα εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Halsted το 1907 και συνεχίστηκε από πολλούς ερευνητές, πολύ δε πρόσφατα από τους Gittes (1967) και Wells (1974). Η πρώτη επιτυχής κλινική μεταμόσχευση των παραθυρεοειδών αδένων έγινε από τον Wells το 1975. Σήμερα εφαρμόζεται στην κλινική πράξη κυρίως η αυτομεταμόσχευση τμημάτων των παραθυρεοειδών αδένων.<sup>1,2,3</sup>

Η προσπάθεια μεταμόσχευσης του πνεύμονα σε πειραματικό στάδιο οφείλεται στους Juvenell, Metras και Standaches το 1950, ενώ η πρώτη κλινική μεταμόσχευση έγινε από τον Hardy το 1963.<sup>1,2,3</sup>

Η καρδιά αποτελούσε για πολλούς αιώνες την πηγή της ζωής και του συναισθήματος, περιοχή απαγορευμένη και απλησίαστη.<sup>1,2,3</sup>

Για πολλά χρόνια ίσχυε στην ιατρική το απόφθεγμα που είχε διατυπώσει ο διάσημος χειρουργός της Βιέννης Billroth (1829-1894) «όποιος τολμήσει να ράψει την καρδιά να είναι βέβαιος ότι θα χάσει την εκτίμηση όλων των συναδέλφων του». Το taboo αυτών των αιώνων καταρρίφθηκε στις 9 Σεπτεμβρίου το 1896 όταν ο Ludwig Rehn έραψε ένα τραύμα καρδιάς που αιμορραγούσε και ο ασθενής επέζησε, στο δημοτικό νοσοκομείο της Φρανκφούρτης.<sup>1,2,3</sup>

Η πρώτη πειραματική μεταμόσχευση καρδιάς ανακοινώθηκε από τον Carrel το 1905. Ωστόσο η μεταμόσχευση καρδιάς παρέμεινε χωρίς επιτυχή εργαστηριακή προσπάθεια μέχρι το 1960, οπότε οι Lower, Stofor και Shumway ανέπτυξαν επιτυχή τεχνική ορθοτοπικής μεταμόσχευσης και έθεσαν τις βάσεις για την κλινική εφαρμογή.<sup>1,2,3</sup>

Έτσι, στις 3 Δεκεμβρίου το 1967, με τη μέθοδο αυτή ο Νοτιοαφρικανός Christian Barnard έκανε με επιτυχία την πρώτη μεταμόσχευση ανθρώπινης καρδιάς.<sup>1,2,3</sup>

Η μεταμόσχευση οργάνων, το μεγάλο αυτό επίτευγμα της ιατρικής επιστήμης, το ξεχωριστό από κάθε άλλη χειρουργική πράξη που τόσα θρησκευτικά, ηθικά, κοινωνικά και συναισθηματικά προβλήματα εγείρει, δεν παρουσιάζει πια αξιόλογες τεχνικές δυσχέρειες. Η χειρουργική επιστήμη, προς τιμή των εκπροσώπων της, έχει κατορθώσει να μεταμοσχεύσει τα περισσότερα ανθρώπινα όργανα. Πρόβλημα της

ακόμη και σήμερα παραμένει η απόρριψη, η οποία παρά τις προσπάθειες για την αντιμετώπισή της, αποτελεί μόνιμο σοβαρό κίνδυνο. Η καλπάζουσα πρόοδος της Ανοσολογίας και των άλλων συναφών ειδικοτήτων έχει επιτύχει σημαντική πρόοδο και στον τομέα αυτό.<sup>1,2,3</sup>

Σημαντικός σταθμός στην επιβίωση των μοσχευμάτων αποτέλεσε η εφαρμογή της κυκλοσπορίνης-Α, τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες της οποίας απέδειξε για πρώτη φορά στον κόσμο ο Καθηγητής της Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Α. Κωστάκης, πραγματοποιώντας μεταμοσχεύσεις καρδιάς σε επίμυες τη 2ετία 1975-77. Έκτοτε το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείται επί 25 συνεχή χρόνια ως ανοσοκατασταλτικό φάρμακο στις μεταμοσχεύσεις όλων των οργάνων με εξαιρετικά αποτελέσματα. Τα τελευταία χρόνια η ανακάλυψη νέων ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, το FK-506, η ραπαμυκίνη, το Mycophenolate Mofetil, τα πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα και τα αντισώματα έναντι των υποδοχέων της ιντερλευκίνης-2 έχουν βελτιώσει ακόμα περισσότερο την επιβίωση όλων των μοσχευμάτων και την ποιότητα ζωής των μεταμοσχευμένων ασθενών.<sup>1,2,3</sup>

Στην Ελλάδα η πρώτη μεταμόσχευση νεφρού από πτωματικό δότη έγινε στη Θεσσαλονίκη από τον Καθηγητή κ. Κ. Τούντα, το 1968 και στην Αθήνα από τον Καθηγητή κ. Γρ. Σκαλκέα και τον συνεργάτη του κ. Ι. Χωματά, το 1971. Η πρώτη μεταμόσχευση ήπατος έγινε στη Θεσσαλονίκη από τον Καθηγητή κ. Α. Αντωνιάδη το 1990 και την ίδια χρονολογία στην Αθήνα από τον Καθηγητή Ι. Παπαδημητρίου. Η πρώτη μεταμόσχευση παγκρέατος που ήταν διπλή ταυτόχρονη μεταμόσχευση νεφρού και παγκρέατος έγινε από τους Καθηγητές κ. Γρ. Σκαρλέα και κ. Α. Κωστάκη το 1989 στο Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών. Η πρώτη μεταμόσχευση καρδιάς έγινε από τον καρδιοχειρουργό κ. Γ. Τόλη στο θεραπευτήριο 'Υγεία' το 1990 και λίγους μήνες αργότερα άρχισε το πρόγραμμα μεταμοσχεύσεων καρδιάς από τον καρδιοχειρουργό κ. Χρ. Λόλα στο Νοσοκομείο 'Ευαγγελισμός'. Η πρώτη μεταμόσχευση πνεύμονα έγινε από τον Καθηγητή κ. Π. Σπύρου στη Θεσσαλονίκη το 1992 και η πρώτη ταυτόχρονη διπλή μεταμόσχευση καρδιάς πνεύμονα έγινε το ίδιο έτος από τον Καθηγητή κ. Π. Σπύρου. Η πρώτη διπλή ταυτόχρονη μεταμόσχευση ήπατος και νεφρού έγινε από τον Καθηγητή κ. Ε. Χατζηγιαννάκη στο Νοσοκομείο

«Ευαγγελισμός» το 1992 και ένα έτος αργότερα έγινε από τον ίδιο Καθηγητή διπλή μεταμόσχευση ήπατος και παγκρέατος.<sup>1,2,3</sup>

Τέλος η πρώτη εμφύτευση νησιδίων παγκρέατος έγινε από τον Επ. Καθηγητή κ. Β. Παπανικολάου στο 'Ιπποκράτειο' Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης το 1999.<sup>1,2,3</sup>

### **A.3. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ**

α) Τελικό στάδιο νόσου κατά το οποίο η βλάβη του πάσχοντος οργάνου είναι ανεπανόρθωτη, π.χ. σε νεφρική ανεπάρκεια.

β) Παιδιά στην ανάπτυξη, νέοι και άτομα που παρουσιάζουν πρόβλημα σε τυχόν υποστηρικτικά μέσα που χρησιμοποιούνται, π.χ. τεχνητός νεφρός, βηματοδότης κ.τ.λ., προηγούνται ανεξάρτητα αιτιολογίας για τη νόσο.

γ) Άτομα με κακό κυκλοφορικό σύστημα, μυοσκελετικά προβλήματα κ.α.<sup>1,2,3</sup>

### **A.4. ΑΝΤΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ**

α) Σηψαιμικές καταστάσεις.

β) Προχωρημένη αθηροσκληρωτική νόσος.

γ) Μεγάλου βαθμού πνευμονική ή ηπατική ανεπάρκεια.

δ) Ηλικία κάτω του 1 έτους και άνω των 45 ετών.

ε) Συνυπάρχουσες παθήσεις, π.χ. σακχαρώδης διαβήτης, ερυθματώδης λύκος, σκληροδερμία, αμυλοείδωση, καρκίνος, φυματίωση κ.τ.λ.<sup>1,2,3</sup>

Απαραίτητη προϋπόθεση για να γίνει δεκτό ένα μόσχευμα αν προέρχεται από πτώμα είναι ότι το άτομο που απεβίωσε θα πρέπει να ήταν απόλυτα υγιές ή να κατέληξε από εγκεφαλική βλάβη, χωρίς επηρεασμό της αιματικής κυκλοφορίας μέχρι τη στιγμή της εκτομής και τοποθέτησης του οργάνου είτε σε μηχανήμα συντήρησης είτε σε έκπλυση με κατάλληλο διάλυμα έκπλυσης μοσχευμάτων.<sup>1,2,3</sup>

## **B. ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ**

### **B.1. ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ**

#### **Εισαγωγή**

Η μεταμόσχευση οργάνων, ξεκινώντας αρχικά ως πειραματική διαδικασία ανάγκης, έχει μετατραπεί τελικά σε έναν τεχνολογικά εξελιγμένο τρόπο θεραπείας. Ιδιαίτερα, η ανοσολογία της μεταμόσχευσης αποτελεί ένα νέο και ελκυστικό τομέα της Ιατρικής με τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον, που απορρέει από την προσπάθεια κατανόησης και ερμηνείας εκείνων των μηχανισμών της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή, που τελικά οδηγούν στην καταστροφή του αλλομοσχεύματος.<sup>1,2,3</sup>

Η βάση για την έναρξη της ειδικής ανοσολογικής απάντησης, μετά την είσοδο ενός αλλοαντιγόνου, είναι η αναγνώριση από το ανοσολογικό σύστημα των «δικών» του από τα «ξένα» στοιχεία. Στις μεταμοσχεύσεις οργάνων ή ιστών, ο βασικός αυτός βιολογικός ρόλος του ανοσολογικού συστήματος διεγείρει τους μηχανισμούς απόρριψης, με αποτέλεσμα την απώλεια των μοσχευμάτων. Τελευταία, με την κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδικασία της απόρριψης του «ξένου» καθώς και με την ανακάλυψη αποτελεσματικών ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, η μεταμόσχευση οργάνων και ιστών για θεραπευτικούς σκοπούς αποτελεί σήμερα καθημερινή κλινική πρακτική.<sup>1,2,3</sup>

Η βελτίωση των χορηγούμενων ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων έχει επηρεάσει ελάχιστα τη μακρόχρονη επιβίωση των μοσχευμάτων. Βασικός παράγοντας για τη μακροχρόνια λειτουργία του μοσχεύματος είναι ο βαθμός ιστοσυμβατότητας δότη-λήπτη ως προς τα δύο μείζονα συστήματα ιστοσυμβατότητας που είναι:

- α) το σύστημα των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων και
- β) το σύστημα ιστοσυμβατότητας ή HLA.<sup>1,2,3</sup>



## B.2. ABO ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ

Η συμβατότητα στα αντιγόνα των ομάδων αίματος θεωρείται βασικός συντελεστής της επιτυχημένης μεταμόσχευσης οργάνων, καθόσον 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 Α ή Β αντιγόνων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία είναι παρόντα στο ενδοθήλιο. Όμως, τελευταία δεδομένα αναφέρουν επιτυχημένη μεταμόσχευση οργάνων με ασυμβατότητα ομάδας αίματος.<sup>1,2,3</sup>

Το ένα τρίτο περίπου των μεταμοσχευμένων οργάνων με ABO ασυμβατότητα δεν απορρίπτεται από μηχανισμούς εξαρτώμενους από το αντίσωμα, η δε επιβίωση του μοσχεύματος είναι ίδια με αυτή των ABO συμβατών μοσχευμάτων, ακόμη και όταν δεν έχει γίνει καμιά ειδική φαρμακευτική αντιαπορριπτική αγωγή. Η επιβίωση του μοσχεύματος παρουσία αντισωμάτων έναντι αντιγονικών καθοριστών του αγγειακού ενδοθηλίου του μοσχεύματος, με φυσιολογικά επίπεδα συμπληρώματος, είναι γνωστή ως «διευκόλυνση».<sup>1,2,3</sup>

α) ABO και νεφρός.

Η πρώτη μεταμόσχευση νεφρού με ABO ασυμβατότητα έγινε από τους Hume, Murray και Starzl με τους συνεργάτες τους τα έτη 1955, 1960 και 1964 αντίστοιχα. Όταν άρχισαν να εφαρμόζονται αυτές οι μεταμοσχεύσεις, σε ορισμένες παρατηρήθηκε μακροχρόνια επιβίωση του μοσχεύματος. Όμως η συνολική εμπειρία απέδειξε ότι σχεδόν στο σύνολο των περιπτώσεων διεγείρονται οι μηχανισμοί υπεροξείας απόρριψης του μοσχεύματος. Τελευταία, λόγω του περιορισμένου αριθμού των προσφερομένων μοσχευμάτων πραγματοποιείται παγκοσμίως όλο και μεγαλύτερος αριθμός ABO ασύμβατων μεταμοσχεύσεων, ιδιαίτερα από ζώντες δότες. Η εξαρτώμενη από το αντίσωμα απόρριψη του μοσχεύματος σε ABO ασύμβατες μεταμοσχεύσεις νεφρού ταξινομείται σε δύο υπότυπους: 1) στην υπεροξεία απόρριψη που εμφανίζεται το πρώτο 24ωρο και 2) στην οξεία χημικού τύπου απόρριψη, που εμφανίζεται σε διάστημα 30 ημερών.

Στην υπεροξεία απόρριψη παρατηρείται δραματική ελάττωση των ούρων, μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων, των αντισωμάτων και των παραγόντων C3 και C4 του συμπληρώματος. Η οξεία απόρριψη χαρακτηρίζεται από προοδευτική συμφόρηση και θρόμβωση των αρτηριών με ανάπτυξη οιδήματος και αιμορραγιών.<sup>1,2,3</sup>

Τελευταία, η εμπειρία από πολλά κέντρα της Ιαπωνίας όπου η μεταμόσχευση από ζώντα δότη με ABO ασυμβατότητα αποτελεί τη μοναδική διέξοδο, έδειξε ότι ο περιορισμός των αντισωμάτων πριν τη μεταμόσχευση με πλασμαφαίρεση με διπλό φίλτρο ήταν πολύ σημαντικός για την επιτυχία της μεταμόσχευσης. Επίσης πολυκεντρικές μελέτες απέδειξαν ότι, μετά την πάροδο των πρώτων κρίσιμων δύο μηνών, μακροχρόνια επιβίωση του μοσχεύματος δεν διαφέρει εκείνης των συμβατών μοσχευμάτων.<sup>1,2,3</sup>

Επισημαίνεται ότι ασθενείς με ομάδα αίματος B έχουν το μεγάλο μειονέκτημα να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στις λίστες αναμονής για μεταμόσχευση, λόγω της σπανιότητας της B ομάδας.<sup>1,2,3</sup>

## β) ABO και ήπαρ

Οι ανατομικές και βιολογικές ιδιότητες του ήπατος συμβάλλουν στην έκβαση της μεταμόσχευσης με ABO ασυμβατότητες. Το ήπαρ παράγει ABO αντιγόνα και δυνητικά δημιουργεί δεσμευτικά αντισώματα στα κύτταρα του Kupffer απομακρύνοντας τα ανοσοσυμπλέγματα. Επίσης, το ήπαρ ανθίσταται στις βλάβες που προκαλούνται από τα αντι-HLA αντισώματα κι αυτός είναι ο λόγος που η διασταύρωση δότη-λήπτη πριν τη μεταμόσχευση δεν είναι απολύτως απαραίτητη. Για όλους αυτούς τους λόγους, το ήπαρ δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην αντισωματική απόρριψη.<sup>1,2,3</sup>

Όμως, η ABO ασυμβατότητα παραμένει σοβαρός παράγοντας κινδύνου για την αντισωματικού τύπου απόρριψη, συμπεριλαμβανομένης και της υπεροξείας απόρριψης. Συνήθως, η ενός έτους επιβίωση του μοσχεύματος, σε ABO ασύμβατα μοσχεύματα ήπατος, είναι 46% σε σχέση με τα συμβατά που ανέρχεται σε 72% περίπου. Τα παιδιατρικά ABO ασύμβατα μοσχεύματα ήπατος παρουσιάζουν καλύτερους χρόνους επιβίωσης των μοσχευμάτων και αυτό ενδεχομένως να οφείλεται είτε σε χαμηλότερους τίτλους των αντι-AB αντισωμάτων είτε σε ανωριμότητα του συστήματος του συμπληρώματος.<sup>1,2,3</sup>

Επομένως, στην παιδική ηλικία, οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την υπεροξεία απόρριψη του μοσχεύματος, είτε απουσιάζουν, είτε βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση. Στα παιδιά, η ενός έτους επιβίωση του ηπατικού μοσχεύματος ανέρχεται σε 70% σε ABO ασύμβατα ηπατικά μοσχεύματα. Στους ενήλικες, η παρουσία ισοσυγκολλητινών και προσχηματισμένων αντισωμάτων, ευθύνονται για την πρόωμη οξεία απόρριψη ηπατικού μοσχεύματος σε ποσοστό περίπου 20-50%.<sup>1,2,3</sup>

Η πριν τη μεταμόσχευση πλασμαφαίρεση για την απομάκρυνση των αντισωμάτων δεν δίδει απαραίτητα τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Αντίθετα, η εφαρμογή έντονης ανοσοκαταστολής μετά τη μεταμόσχευση ήπατος έχει θετικά αποτελέσματα στην επιβίωση του μοσχεύματος.<sup>1,2,3</sup>

Στην ABO μη ταυτόσημη, αλλά συμβατή μεταμόσχευση ήπατος, παράγονται αντισώματα που προέρχονται από το μόσχευμα όπως παράγονται μετά από ABO ασύμβατη μεταμόσχευση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων. Η παραγωγή των αντισωμάτων αυτών ενδέχεται να οφείλεται στην αιμόλυση που παρατηρείται 7-14 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση, η οποία πολλές φορές είναι βαρείας μορφής. Η θεραπεία είναι αρκετά επιθετική με διουρητικά και πλασμαφαίρεση για την απομάκρυνση των αντισωμάτων.<sup>1,2,3</sup>

γ) ABO και καρδιά-πνεύμονες.

Η εμπειρία στις ABO μη συμβατές μεταμοσχεύσεις καρδιάς είναι ιδιαίτερα περιορισμένη, διότι περιορίζεται μόνο σε συγκεκριμένες ή επείγουσες περιπτώσεις. Στις αρχές της δεκαετίας του 90, στα δύο τρίτα των περιστατικών εμφανίστηκε υπεροξεία απόρριψη του μοσχεύματος, ενώ το 2001 τα αποτελέσματα ήταν περισσότερο ικανοποιητικά.<sup>1,2,3</sup>

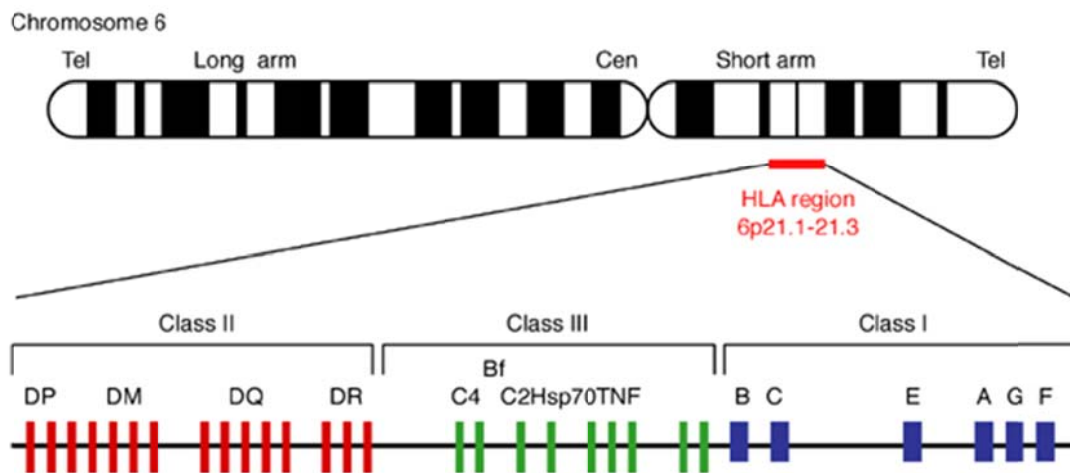
Οι περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων πνευμόνων ή καρδιάς και πνευμόνων, με ABO ασύμβατες ομάδες αίματος είναι εξαιρετικά σπάνιες και έγιναν με παράλληλη συμφωνία του λήπτη.<sup>1,2,3</sup>

Συμπερασματικά, η μεταμόσχευση οργάνων με ABO ασυμβατότητα, επιτυγχάνεται ενδεχομένως, μόνον όταν υπάρχει μειωμένη έκφραση του αντιγόνου στο μόσχευμα. Η μέχρι σήμερα εμπειρία επισημαίνει ότι η απομάκρυνση των αντισωμάτων πριν τη μεταμόσχευση δεν εγγυάται την έκβαση της μεταμόσχευσης ιδίως στους ενήλικες. Η ανάγκη έντονης ανοσοκαταστολής δεν έχει καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα, αλλά είναι βέβαιο ότι η καταστολή και των δύο πληθυσμών T και B λεμφοκυττάρων πιθανώς να καταστέλλουν την παραγωγή των αντισωμάτων. Οι μηχανισμοί που προστατεύουν το ABO ασύμβατο μόσχευμα δεν είναι γνωστοί. Όμως, παρ' όλες τις προσπάθειες για τη χρήση ABO μη συμβατών οργάνων, η επιβίωση των μοσχευμάτων σε αυτές τις μεταμοσχεύσεις δεν συγκρίνεται με τα αποτελέσματα των μεταμοσχεύσεων με ABO συμβατό δότη. Χρειάζεται ακόμη αρκετή ερευνητική προσπάθεια στο τομέα αυτό.<sup>1,2,3</sup>

### **B.3. ΤΟ ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**

Ο όρος Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) προέρχεται από πειραματικές μελέτες σε πειραματόζωα, που είχαν σκοπό να ερευνήσουν την τύχη μεταμοσχευμένων ιστών. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραματικών μελετών οδήγησαν στην αναγνώριση ενός σημαντικού συνόλου γονιδίων υπεύθυνων για τον έλεγχο αποδοχής ή απόρριψης μοσχευμάτων μεταξύ όμοιων ή ανόμοιων γενετικά ατόμων, το οποίο ονομάστηκε Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας.<sup>5</sup>

Το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC) εντοπίζεται στον άνθρωπο, στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (εικ.1) και αποτελεί το πλέον πολυμορφικό σύστημα του γονιδιώματος. Τα προϊόντα του συστήματος αυτού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, τόσο στην ανοσιακή απάντηση του οργανισμού, όσο και στην επιβίωση ή μη του μοσχεύματος. Τα τελευταία χρόνια, ραγδαίες εξελίξεις στην DNA τεχνολογία κατέστησαν δυνατή την ανάλυση του συστήματος σε επίπεδο αλληλομόρφων. Το MHC αναφέρεται στον άνθρωπο, ως ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (HLA). Τα αντιγόνα αυτά ονομάστηκαν έτσι, επειδή αναφέρονται στις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του MHC και εκφράζονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των λευκοκυττάρων. Το MHC του ανθρώπου είναι ένα πολύμορφο γενετικό σύστημα αποτελούμενο από 250 περίπου άνισα κατανεμημένα γονίδια. Οι πρώτες αποδείξεις για την ύπαρξη του MHC στον άνθρωπο προήλθαν από μελέτες σε ορούς πολυμεταγγιζόμενων ατόμων και πολύτοκων γυναικών.<sup>1,2,3</sup>

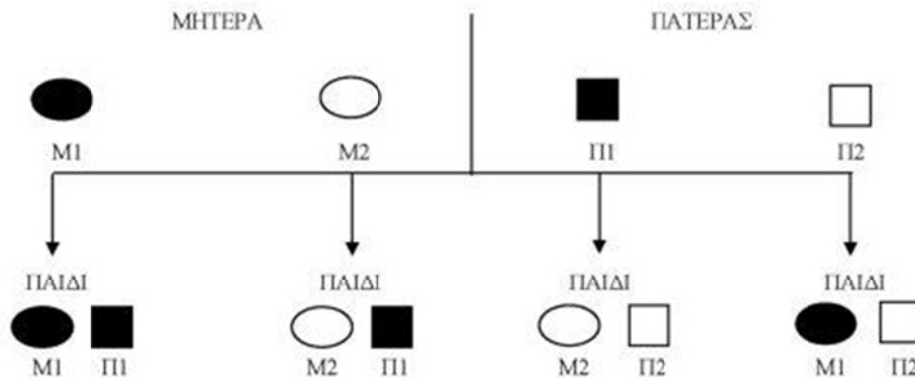


### B.3.1. ΤΟ HLA ΣΥΣΤΗΜΑ

Η ορολογία HLA προέρχεται από το «Human Leukocyte Antigen series A» και περιγράφει την πρώτη γονιδιακή θέση που ανακαλύφθηκε στο ανθρώπινο MHC. Από τη διαμάχη για την προέλευση του όρου προέκυψε τελικά ο γενικότερος όρος “Human Leucocyte Antigens” που μεταφράζεται σε ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα. Τα αντιγόνα αυτά είναι πρωτεϊνικά μόρια τα οποία κληρονομούνται από τους γονείς του κάθε ατόμου(εικ.2). Είναι σημαντικό στη μεταμόσχευση οργάνων να καθορίζεται πόσο «συμβατά» είναι τα HLA του υποψήφιου λήπτη με τα HLA του δότη του οργάνου. Ο βαθμός της «συμβατότητας» μεταξύ δότη και λήπτη καθορίζεται από τον αριθμό των HLA μορίων που οι δύο αυτοί άνθρωποι έχουν κοινά. Η HLA συμβατότητα συνήθως στηρίζεται σε 6 HLA μόρια. Όσο περισσότερα κοινά αντιγόνα έχουν δύο άτομα τόσο καλύτερη είναι και η συμβατότητα. Ο πιο πιθανός τρόπος να βρεθούν δύο «συμβατά» άτομα είναι μεταξύ αδελφών. Εάν δύο αδέρφια έχουν κληρονομήσει τα ίδια HLA και από τους δύο γονείς θεωρούνται «ταυτόσημα». Ωστόσο και δύο μη συγγενή άτομα μπορεί να τύχει να έχουν καλή HLA συμβατότητα. Πριν ανακαλυφθούν ισχυρά φάρμακα (τα λεγόμενα ανοσοκατασταλτικά) που εμποδίζουν την απόρριψη του ξένου μοσχεύματος από το σώμα του λήπτη η HLA συμβατότητα ήταν πολύ σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της μεταμόσχευσης. Αλλά σήμερα έχουμε πολύ καλά αποτελέσματα ακόμα και μεταξύ μη σημαντικά συμβατών δοτών – ληπτών λόγω των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων που βελτιώνονται με τα χρόνια. Για το λόγο αυτό η άριστη «συμβατότητα» δεν είναι τόσο σημαντική για την επιτυχία της μεταμόσχευσης οργάνου, διευρύνοντας τις μεταμοσχευτικές δυνατότητες της εποχής.<sup>7</sup>

Τα HLA σύστημα κωδικοποιεί τρία είδη γλυκοπρωτεϊνών, τα τάξης I, τάξης II και τάξης III μόρια. Από αυτά τα τάξης I και II μόρια αναφέρονται και ως αντιγόνα HLA ή αλλοαντιγόνα γιατί μπορεί να αναγνωριστούν από το ανοσιακό σύστημα κατά την απόρριψη μοσχευμάτων μεταξύ HLA ανόμοιων ατόμων. Ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά των μορίων αυτών είναι ο πολυμορφισμός τους. Αυτό σημαίνει ότι κάθε τάξη μορίων, ακόμη και κάθε γονιδιακή θέση περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό παραλλαγών αντιγονικών μορίων και γονιδίων αντίστοιχα.<sup>7</sup>

Η γονιδιακή θέση ή τόπος (locus) αναφέρεται σε ένα μοναδικό γονίδιο που ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα γειτονικά γονίδια και κωδικοποιεί ένα μοναδικό προϊόν, συμβολίζεται δε με ένα κεφαλαίο γράμμα. Οι παραλλαγές των μορίων που ανευρίσκονται μέσα σε ένα πληθυσμό αναφέρονται ως γονιδιακές μορφές ή αλληλία (alleles). Με άλλα λόγια διαφορετικά άτομα-μέλη ενός πληθυσμού μπορεί να έχουν ποικίλα αλληλία για μια γονιδιακή θέση.<sup>7</sup>



**ΕΙΚΟΝΑ 2.** Κληρονομικότητα του συστήματος HLA. (Διδακτορική Διατριβή Πέτρου Α. Γαλάνη, 2006)

### B.3.2. Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΣΙ

Οι αρχικές μελέτες πάνω στο ανθρώπινο Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας όπως άλλωστε συμβαίνει στον τομέα της γενετικής αναπτύχθηκαν με πρωτοπόρες εργασίες πάνω σε ζώα. Κατά τις δεκαετίες του '30 και '40 οι Peter Gorer και George Snell δούλεψαν πάνω στη γενετική και ανοσολογία των όγκων σε μεταμοσχευμένα ποντίκια. Αμέσως μετά ο Peter Medawar ασχολήθηκε με τους κυτταρικούς μηχανισμούς, τους υπεύθυνους για την απόρριψη μεταμοσχευμένου δέρματος και οργάνων στα ποντίκια. Η ιστορία του ανθρώπινου MHC έρχεται αρκετά μεταγενέστερα όταν το 1958 οι Dausset και Payne έδειξαν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, ότι πολυμεταγγισμένοι ασθενείς και έγκυες γυναίκες συχνά είχαν στον ορό τους κυκλοφορούντα αντισώματα κατά αλλοαντιγόνων που τώρα πλέον είναι γνωστό ότι είναι προϊόντα των γονιδίων του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας.<sup>5,7</sup>

Η εντυπωσιακή γνώση του HLA συστήματος και των αντιγονικών προϊόντων του συγκεντρώθηκε μέσα σε 30 χρόνια, αντανakλώντας την αξιοσημείωτη διεθνή συνεργασία μεταξύ των πολυάριθμων ερευνητών στον τομέα αυτό. Μια σειρά από διεθνή συνέδρια ιστοσυμβατότητας έδωσαν την ευκαιρία σε επιστήμονες από όλο τον κόσμο να συζητήσουν τα αποτελέσματα των μελετών τους αφού προηγουμένως αντάλλαξαν γνώσεις και την πείρα τους πάνω σε αντιδραστήρια και τεχνικές. Μετά από κάθε συνέδριο μια επιτροπή ονοματολογίας από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας εκσυγχρονίζει το παγκόσμιο αποδεκτά "λεξικό" των HLA και ενημερώνει όλους τους επιστήμονες με δημοσιεύσεις σε σχετικά επιστημονικά περιοδικά.<sup>5,7</sup>

Η ανάγκη κατανόησης του HLA συστήματος προωθήθηκε από τη μεγάλη έκταση των μεταμοσχεύσεων οργάνων και ιστών. Ο θεμελιώδης ρόλος της άμεσης δοκιμασίας ιστικής διασταύρωσης (crossmatch) στην πρόληψη της υπεροξείας απόρριψης του νεφρικού μοσχεύματος εδραιώθηκε από τον Kissmeyer-Nielsen ο οποίος έδειξε ότι η μεταμόσχευση νεφρού μετά από θετική δοκιμασία ιστικής διασταύρωσης μεταξύ του ορού του λήπτη και των λεμφοκυττάρων του δότη οδηγεί σε άμεση μη αναστρέψιμη απόρριψη(1966). Πολλοί επιστήμονες συνεισέφεραν στη σημερινή γνώση της ιστοσυμβατότητας μεταξύ των οποίων οι Benacerraf, Dausset και Snell που τιμήθηκαν με βραβείο Nobel το 1980 για την ανακάλυψη του ανθρώπινου MHC (HLA) και του MHC του ποντικιού και για την έρευνά τους πάνω στο ρόλο του MHC στην ανοσιακή απάντηση.<sup>5,7</sup>

Για την ανίχνευση των HLA αντιγόνων χρησιμοποιήθηκαν αρχικά τεχνικές συγκόλλησης λευκών αιμοσφαιρίων, στη συνέχεια η τεχνική της λεμφοκυτταροτοξικότητας, ο θάνατος δηλαδή, των κυττάρων στόχων από ειδικά αντι-HLA αντισώματα, που επικράτησε όταν το 1964 οι Terassaki και McClelland ανέπτυξαν την τεχνική της μικρολεμφοκυτταροτοξικότητας (microlymphocytotoxicity test). Η τεχνική αυτή είναι σήμερα μέθοδος ρουτίνας για την ορολογική τυποποίηση και την άμεση διασταύρωση δότη-λήπτη. Τροποποιήσεις της τεχνικής αυτής έγιναν αρκετές, κυρίως αλλάζοντας τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των νεκρών κυττάρων ή αλλάζοντας τους χρόνους και τις θερμοκρασίες επώασης. Παρόλα αυτά η αρχή της μεθόδου παραμένει η ίδια.<sup>5,7</sup>



Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των μονοκλωνικών αντισωμάτων υποσχέθηκε καλύτερη ποιότητα μονοειδικών αντιωρών, όχι όμως για όλα τα αντιγόνα HLA.<sup>5,7</sup>

Η εξέλιξη των τεχνικών για την αναγνώριση των ποικιλιών των γονιδιακών αλληλουχιών οδήγησε σε μια θεμελιώδη αλλαγή στη μεθοδολογία της τυποποίησης των HLA αντιγόνων. Στα μέσα της δεκαετίας του '80 εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανάλυσης των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs), με την οποία αναγνωρίζονται όλες οι γνωστές ορολογικές ειδικότητες των HLA-DR και -DQ αντιγόνων.<sup>5,7</sup>

Με την εμφάνιση ,το 1987, της μεθόδου μεγέθυνσης του DNA με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και με τη γνώση των αλληλουχιών των HLA αντιγόνων για τη σύνθεση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων -αφετηριών (Sequence Specific Primers, SSP) έγινε πλέον εφικτός ένας ακριβέστερος καθορισμός των γονιδιακών πολυμορφισμών των HLA αντιγόνων, χρησιμοποιώντας μικροποσότητες DNA από οποιοδήποτε σχεδόν είδος ιστού.<sup>5,7</sup>

### **B.3.3. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΤΟΥ HLA ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Η εφαρμογή των τεχνικών μοριακής βιολογία επέτρεψε να ανακαλύψουν τη γονιδιακή οργάνωση του συστήματος. Ο καθιερωμένος γενετικός χάρτης για το σύστημα περιλαμβάνει ένα χρωμοσωμικό τμήμα, μήκους περίπου 3500 βάσεων (kilobases, kb) στην p213 ταινία πάνω στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6. Ογδόντα δύο γονίδια και ψευδογονίδια αναγνωρίστηκαν πάνω στο τμήμα αυτό, ομαδοποιημένα σε τρεις τάξεις ανάλογα με την τοπογραφική θέση τους ως προς το κεντρομέρος του χρωμοσώματος, αλλά και ως προς την ομοιότητα στη δομή και τη λειτουργία των προϊόντων που κωδικοποιούν. Σύμφωνα, λοιπόν, με το χάρτη αυτό υπάρχουν 17 γονίδια τάξης I στο τελομερικό άκρο του συστήματος εκ των οποίων μόνο τα τρία εκφράζονται, τα A, B και C γονίδια, 29 τάξης II στο κεντρομερικό άκρο μεταξύ των οποίων κυρίως τα HLA-DR, -DQ και -DP γονίδια ( HLA-D γονίδια) και 36 τάξης III που εντοπίζονται μεταξύ των γονιδίων HLA-DR και HLA-B.<sup>5,7</sup>

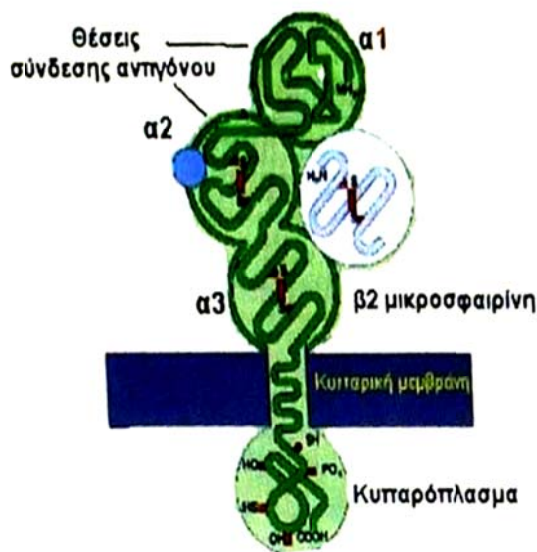
Η περιοχή αυτή των τάξης III γονιδίων περιλαμβάνει γονίδια για τους παράγοντες του συμπληρώματος (C4A,C4B,Bf και C2), τα γονίδια 21B και 21A του στεροειδούς ενζύμου 21-υδροξυλάση, τα γονίδια A και B του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) και τα γονίδια HSP70-1 και HSP70-2 της πρωτεΐνης οξείας φάσης HSP70.<sup>5,7</sup>

Αναπόφευκτα, πολλά από αυτά τα γονίδια δεν έχουν ανοσολογική λειτουργία και βρέθηκαν κατά τύχη στο χρωμοσωμικό αυτό τμήμα ή ίσως κωδικοποιούν πρωτεΐνες των οποίων οι λειτουργίες δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί αλλά πιθανόν να αποδειχθούν σημαντικά.<sup>5,7</sup>

## **B.3.4. ΔΟΜΗ ΤΩΝ HLA ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΩΝ**

### **B.3.4.1. Δομή των HLA τάξης I μορίων**

Οι βασικές δομικές μονάδες των τάξης I μορίων αποτελούνται από μια βαριά αλυσίδα (α αλυσίδα) των 340 αμινοξέων και από μια ελαφριά αλυσίδα, την β2-μικροσφαιρίνη (microglobulin, -m) που κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 15(εικ.3). Η βαριά αλυσίδα είναι το μόνο μέλος του ετεροδιμερούς μορίου που διασχίζει τη διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης με το αμινοτελικό τμήμα της προς το εξωτερικό του κυττάρου. Η β2-μικροσφαιρίνη συνδέεται με το εξωκυττάριο κομμάτι της βαριάς αλυσίδας και χωρίς τη σύνδεση αυτή το λειτουργικό τάξης I μόριο δεν εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια.<sup>9</sup>



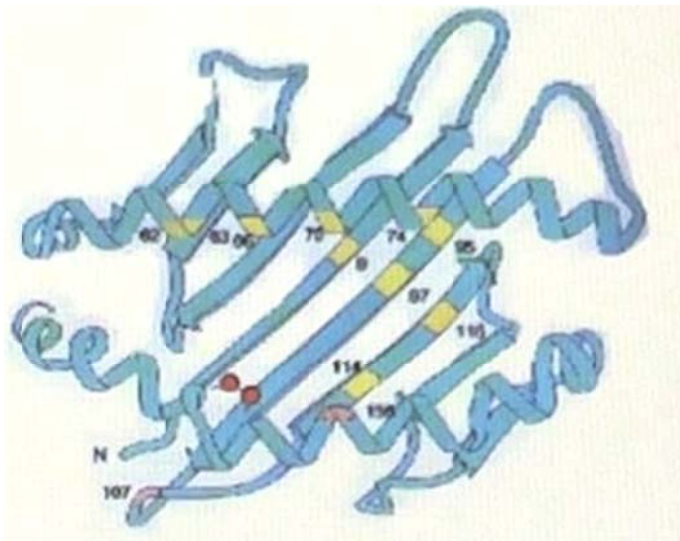
Η βαριά αλυσίδα έχει τρεις καλά διαφοροποιημένες δομικές περιοχές, ένα εξωκυττάριο τμήμα από 274 αμινοξέα, ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα των 25 αμινοξέων, υπεύθυνο για το «αγκυροβόλημα» του μορίου στη μεμβράνη και ένα υδρόφιλο ενδοκυττάριο άκρο των 30 αμινοξέων. Συγκεκριμένα το εξωκυττάριο τμήμα διαιρείται με τη σειρά του σε τρεις περιοχές των 90,92 και 92 αμινοξέων αντίστοιχα που χαρακτηρίζονται ως α1, α2 και α3 περιοχές. Κάθε μια από τις α2, α3 και β2m περιέχει έναν εσωτερικό δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των θέσεων των αμινοξέων 101-164, 203-259 και 25-81, αντίστοιχα. Η α1 περιοχή δεν έχει δισουλφιδικούς δεσμούς, αλλά ένα μοναδικό κομμάτι υδατάνθρακα στη θέση 86.<sup>9</sup>

Η μεγαλύτερη ποικιλία στον δομικό πολυμορφισμό των HLA τάξης I μορίων εντοπίζεται στις α1 και α2 περιοχές, σε σημεία που λέγονται υπερμεταβλητές περιοχές (hypervariable regions, HVR). Οι N-τελικές α1 και α2 περιοχές παρουσιάζουν κάποια ομολογία στις αλληλουχίες τους, όχι όμως και με την α3. Ωστόσο, η α3 εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τη β2 μικροσφαιρίνη και μαζί και οι δύο μεγάλη ομοιότητα στις αλληλουχίες των σταθερών περιοχών των ανοσοσφαιρινών.<sup>9</sup>

Ως εκτούτου τα τάξης I μόρια μοιράζονται την κοινή εξελικτικά καταγωγή τους με τις ανοσοσφαιρίνες και θεωρούνται μέλη της μεγάλης οικογένειας των

ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin superfamily), η οποία περιλαμβάνει ακόμη τον T-κυτταρικό υποδοχέα, (TcR), και τα CD4 και CD8 μόρια προσκόλλησης.<sup>9</sup>

Πρόσφατα με την κρυσταλλογράφηση των HLA τάξης I μορίων μελετήθηκε η τρισδιάστατη δομή τους. Οι α1 και α2 περιοχές της βαριάς αλυσίδας συνδυάζονται για να σχηματίσουν ένα στέρεο οικοδόμημα όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο. Σε αυτή την διαμόρφωση δύο α-έλικες σχηματίζουν τα πλευρικά τοιχώματα μια μακριάς και βαθιάς σχισμής, ο πυθμένας της οποίας αποτελείται από μια β-πτυχωτή επιφάνεια. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας σχισμοειδούς θήκης (groove, cleft)(εικ.4), όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο(peptide-binding site) για να παρουσιαστεί στο CD8+T λεμφοκύτταρο. Κάθε HLA τάξης I μόριο έχει τη δική του ειδικότητα για σύνδεση με αντιγονικά πεπτίδια, ειδικότητα που καθορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων στα τοιχώματα και τον πυθμένα της θήκης. Η σύνδεση των πεπτιδίων δεν είναι τόσο ειδική με αποτέλεσμα κάθε τάξης I μόριο να μπορεί να συνδεθεί με ένα αρκετά μεγάλο φάσμα πεπτιδίων. Αυτό έχει ως συνέπεια ακόμη και ο περιορισμένος αριθμός των διάφορων τάξης I μορίων( όχι πάνω από 6) που εκφράζονται από κάθε άτομο να το καθιστά ικανό να απαντήσει στα περισσότερα αντιγόνα που του παρουσιάζονται από τα μόρια αυτά.<sup>9</sup>

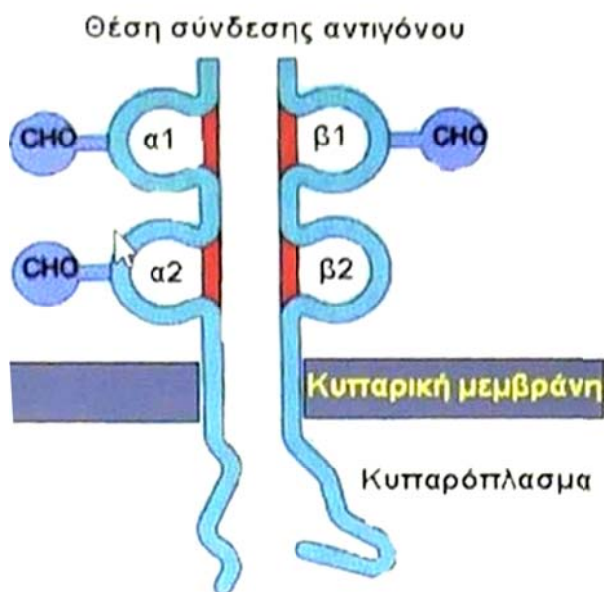


ήκη.  
)

### B.3.4.2. Δομή των HLA τάξης II μορίων

Η δομή των HLA τάξης II μορίων διαφέρει από αυτή των τάξεων I, καθώς τα τάξης II είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα ετεροδιμερή που αποτελούνται από δύο α και β πολυπεπτιδικές αλυσίδες των 230 περίπου αμινοξέων(εικ.5).<sup>9</sup>

Και οι δύο αλυσίδες διασχίζουν την κυτταρική μεμβράνη και κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στην περιοχή. Κάθε αλυσίδα έχει δύο εξωτερικές περιοχές των 90-100 αμινοξέων α1 και α2,β1και β2 αντίστοιχα. Η α1 περιοχή δεν περιέχει δισουλφιδικό δεσμό, ενώ η β1 περιέχει μεταξύ των θέσεων 15 και 79 των αμινοξέων. Οι περιοχές α2 και β2 που βρίσκονται πιο κοντά στην κυτταρική μεμβράνη περιέχουν επίσης δισουλφιδικούς δεσμούς και παρουσιάζουν έντονη ομολογία των αλληλουχιών τους με τις σταθερές περιοχές των ανοσοσφαιρινών. Για το λόγο αυτό λοιπόν τα HLA τάξης II μόρια συμπεριλαμβάνονται επίσης στη μεγάλη οικογένεια των ανοσοσφαιρινών.<sup>9</sup>



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. Από τη σύγκριση των DR αλληλίων φαίνεται ότι οι πολυμορφικές θέσεις είναι διασκορπισμένες κατά μήκος της β1 περιοχής, ωστόσο οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται κυρίως στις θέσεις 9-13,27-33 και 67-74 των αμινοξέων. Οι τρεις παραπάνω περιοχές αποτελούν και τους στόχους των διαφόρων μεθόδων τυποποίησης που εφαρμόζονται για την ανίχνευση του πολυμορφισμού των HLA τάξης II αλληλίων με τις νεότερες μοριακές τεχνικές. Τα HLA-DQ και -DP μόρια εμφανίζουν πολυμορφισμό και στις δύο α και β αλυσίδες τους.<sup>9</sup>

### **B.3.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ HLA ΜΟΡΙΩΝ**

Το γενικό πλαίσιο στο οποίο μελετήθηκαν τα προϊόντα MHC του αποδίδεται από την αρχική ονομασία τους που ήταν αντιγόνα μεταμόσχευσης. Η κατανόηση του βιολογικού ρόλου των MHC μορίων βασίστηκε σε πειράματα πάνω στο γενετικό έλεγχο της ειδικής ανοσιακής απάντησης έναντι θυμοεξαρτημένων αντιγόνων. Οι μελέτες που έγιναν αποκάλυψαν ότι γονίδια μέσα στην HLA περιοχή, που ορίζονται ως γονίδια ανοσιακής απάντησης (Immune response genes, Ir) καθορίζουν την ικανότητα των T λεμφοκυττάρων να απαντούν σε θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα. Κάθε άτομο διαφέρει στην ικανότητα του να απαντά σε αντιγόνα κάτω από τον έλεγχο τέτοιων Ir γονιδίων.<sup>9</sup>

Η φύση των αντιγονικών καθοριστών ή επιτόπων που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα αποτέλεσε ένα από τα θεμελιώδη ενδιαφέροντα των ανοσολόγων. Επειδή για μεγάλο χρονικό διάστημα τα αντισώματα ήταν τα μοναδικά μόρια του ανοσιακού συστήματος ικανά να συνδεθούν με αντιγόνα, εκτιμήθηκε ότι η κυτταρική ειδική ανοσιακή απάντηση κατευθύνεται επίσης προς τους αντιγονικούς επιτόπους. Το γενικότερο συμπέρασμα που προέκυψε το 1959 από παρατηρήσεις και μελέτες είναι ότι τα ξένα αντιγόνα πρέπει να προσληφθούν με ενδοκυττάρωση (πινοκύττωση) από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, να καταβολιστούν στα ενδοσωμάτια και λυσοσωμάτια ώστε να σχηματιστούν ξεδιπλωμένα κομμάτια που περιέχουν τους μέχρι τώρα κρυμμένους επιτόπους που αναγνωρίζουν τα ειδικά T λεμφοκύτταρα.<sup>9</sup>

### **B.3.6. ΑΜΕΣΗ ΚΑΙ ΕΜΜΕΣΗ ΟΔΟΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΤΩΝ HLA ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ**

Τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν τα ξένα HLA αντιγόνα (τα HLA αντιγόνα του δότη) με δύο ξεχωριστές οδούς, είτε άμεσα ως άθικτα μόρια ή έμμεσα ως πεπτίδια που προκύπτουν από την αντιγονική επεξεργασία.<sup>9</sup>

Σύμφωνα με την άμεση οδό παρουσίασης, τα αντιγονοπαρουσιαστικά (APC) κύτταρα του δότη παρουσιάζουν τα HLA αντιγόνα του δότη κατευθείαν στον Τ κυτταρικό υποδοχέα ενός Τ κυττάρου του λήπτη. Τα HLA αντιγόνα του δότη μπορεί τη στιγμή της παρουσίασης τους στον Τ-κυτταρικό υποδοχέα (TcR) του λήπτη να έχουν κενή τη σχισμοειδή τους θήκη ή να επεξεργάζονται ένα πεπτίδιο.<sup>9</sup>

Για την αναγνώριση με την έμμεση οδό, τα αλλογενή HLA μόρια, του δότη, αφού επεξεργαστούν, μετατραπούν δηλαδή σε μικρότερα πεπτίδια από τα APC του λήπτη, παρουσιάζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αναγνωρίζουν οποιοδήποτε αντιγόνο. Τα αλλοαντιγόνα αποπίπτουν από το μόσχευμα εκλαμβάνονται από τα APC του λήπτη ως εξωγενή αντιγόνα, ως εκ τούτου CD4+ Τ λεμφοκύτταρα που, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αναγνωρίζουν πεπτίδια συνδεδεμένα με HLA τάξης II μόρια, κυριαρχούν στην απάντηση κατά των αλλοαντιγόνων που παρουσιάζονται με την έμμεση οδό.<sup>9</sup>

#### **B.3.6.1. ΠΩΣ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΕΜΠΟΔΙΣΟΥΝ ΜΙΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ;**

Τα αντισώματα HLA είναι πρωτεΐνες που να ανιχνεύονται στο αίμα μερικών υποψήφιων ληπτών και ενδέχεται να εμποδίζουν την επιτυχή μεταμόσχευση. Τα αντισώματα HLA μπορεί να επιτεθούν στο μόσχευμα και να οδηγήσουν στην απόρριψη του μοσχεύματος. Για το λόγο αυτό όλοι οι ασθενείς που εντάσσονται σε λίστα μεταμόσχευσης ελέγχονται για τα αντισώματα HLA που μπορεί να έχουν. Οι άνθρωποι αναπτύσσουν HLA αντισώματα μετά από κυήσεις, μεταγγίσεις αίματος ή προηγούμενη μεταμόσχευση, όταν δηλαδή έχουν έρθει σε επαφή με κύτταρα άλλων ανθρώπων. Όταν αυτά τα αντισώματα ανιχνεύονται τότε

λέμε ότι ο ασθενής είναι «ευαισθητοποιημένος» δηλαδή υπάρχει πιθανότητα ο οργανισμός του να λειτουργήσει απορριπτικά σε ένα, εκ πρώτης όψεως, συμβατό μόσχευμα. Τα επίπεδα των HLA αντισωμάτων αναφέρονται ως PRA (Panel Reactive Antibody). Το PRA μας λέει απέναντι σε τι ποσοστό από το γενικό πληθυσμό ο ασθενής έχει HLA αντισώματα και μας δίνει μια καλή πληροφορία για το πόσο εύκολο είναι για τον ασθενή αυτό να βρεθεί ένας συμβατός δότης. Η παρουσία στον ασθενή αντισωμάτων με ειδικότητα στα HLA μόρια του δότη δημιουργεί ένα πραγματικό πρόβλημα στην απόφαση και την έκβαση της μεταμόσχευσης. Για να αντιμετωπισθεί αυτό το πρόβλημα πολλά μεταμοσχευτικά κέντρα έχουν αναπτύξει διάφορες μεθόδους απομάκρυνσης των αντισωμάτων (απευαισθητοποίηση) συμπεριλαμβανομένης της χρήσης ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (IVIg),πλασμαφαιρέσεων ή νέων φαρμάκων, που καταστρέφουν τα κύτταρα που παράγουν τα αντισώματα. Δυστυχώς, η αντίδραση των ασθενών δεν είναι πάντα επιτυχής και η μείωση των αντισωμάτων είναι πρόσκαιρη. Αυτό συμβαίνει γιατί οι θεραπείες αυτές οδηγούν στην μερική μείωση της αντίδρασης στα HLA μόρια του δότη. Ο στόχος της θεραπείας που ελαττώνει τα αντισώματα είναι να ελαττωθούν προσωρινά τα αντισώματα και να δημιουργηθεί ένα «παράθυρο» ώστε να καταστεί δυνατή η μεταμόσχευση.<sup>9</sup>

### **B.3.6.2. ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ HLA ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Οι κύριες εφαρμογές του συστήματος HLA είναι οι εξής:

- α) Στις μεταμοσχεύσεις
- β) Στον αποκλεισμό πατρότητας
- γ) Σε ανθρωπολογικές μελέτες – φυλογενετική ανάλυση πληθυσμών
- δ) Σε συσχέτιση HLA και ασθενειών<sup>47</sup>



## **B.4. ΕΛΑΣΣΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**

Η μεταμόσχευση νεφρού μεταξύ HLA ταυτόσημων αδελφών εμφανίζει ένα ποσοστό 10% περίπου απόρριψης του μοσχεύματος. Βασικό αίτιο της απόρριψης είναι η ύπαρξη ελασσόνων συστημάτων ιστοσυμβατότητας. Τα αντιγόνα αυτά (mH), έχουν αντικείμενο ανάλυσης, επειδή εμπλέκονται στους μηχανισμούς απόρριψης. Ο όρος mH αντιγόνο αναφέρεται σε ένα πεπτίδιο, το οποίο συνδέεται με ένα τάξης I και II HLA αντιγόνο. Το πεπτίδιο αυτό μπορεί να είναι ένα ενδογενές πεπτίδιο ή υπεραντιγόνο στον ιστό του δότη που αναγνωρίζεται ως ξένο από τα κύτταρα του λήπτη. Θεωρητικά κάθε πολυμορφική πρωτεΐνη ίσως να αντιπροσωπεύει ένα δυνητικό mH, όταν κατά την επεξεργασία της σχηματίζει ένα πεπτίδιο που συνδέεται με τάξης I και II HLA αντιγόνα και παρουσιάζεται στα T-λεμφοκύτταρα.<sup>1,2,3,4</sup>

Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, η ονομασία «ελάσσονα» δεν φαίνεται να ευσταθεί, γιατί ο ρόλος τους είναι σημαντικός στην αλλοαναγνώριση.  
<sup>1,2,3,4</sup>

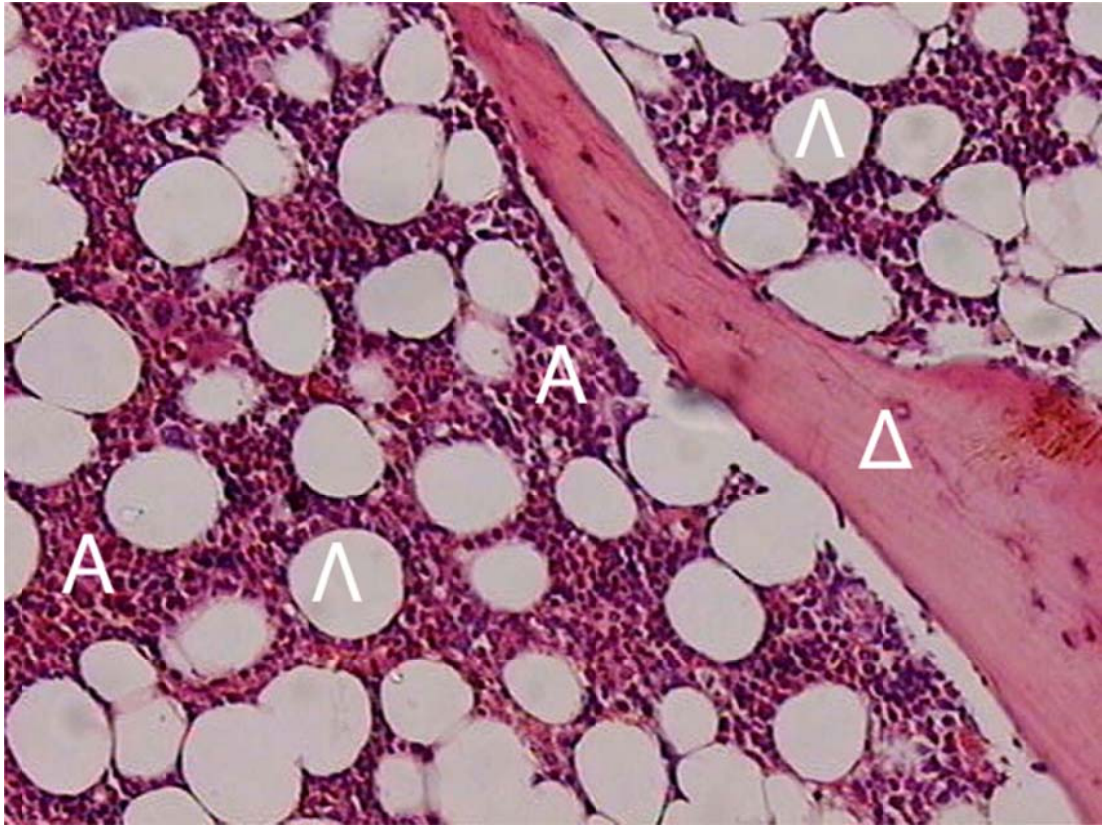
## **Γ. ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

### **Γ.1. Ορισμός**

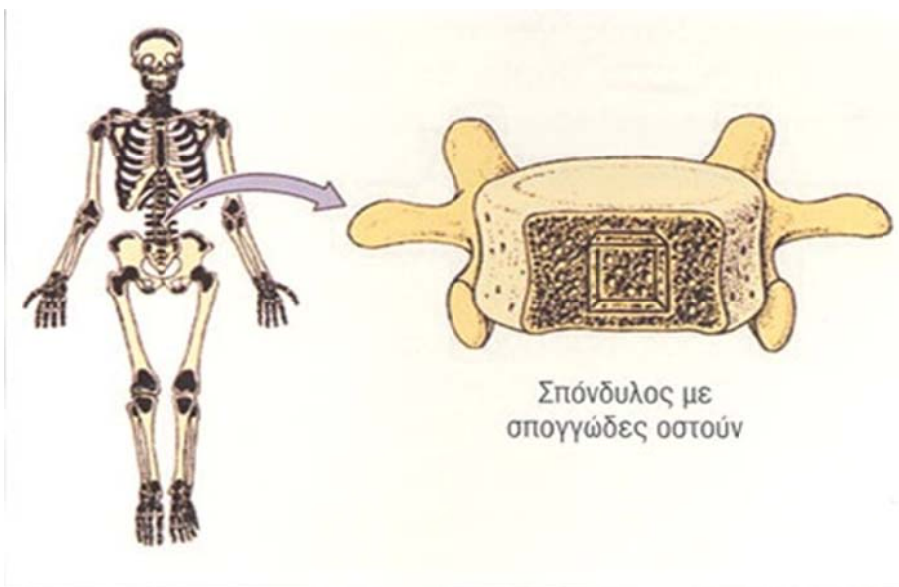
Ο μυελός των οστών είναι ο σπογγώδης ιστός που υπάρχει μέσα στις κοιλότητες των οστών, όπου παράγονται όλα τα κύτταρα του αίματος. Καθένα από τα κύτταρα του αίματος ξεκινάει τη ζωή του ως ένα αρχέγονο-μητρικό κύτταρο. Τα αρχέγονα αυτά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν όλα τα κύτταρα που αποτελούν το αίμα και το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτά περιλαμβάνουν τα λευκά αιμοσφαίρια που καταπολεμούν λοιμώξεις, τα ερυθρά που μεταφέρουν κατά κύριο λόγο το οξυγόνο και τα αιμοπετάλια που συμμετέχουν στην πήξη του αίματος. Ο μυελός των οστών είναι πολύ σημαντικός διότι χωρίς αυτόν και τα άλλα κύτταρα που καταπολεμούν τις ασθένειες, το ανοσοποιητικό σύστημα θα είχε σοβαρή βλάβη και η άμυνα του οργανισμού θα ήταν πολύ μειωμένη ακόμη και στην καταπολέμηση της πιο κοινής μόλυνσης. Επομένως γίνεται αντιληπτό ότι η οποιαδήποτε αλλαγή στη

λειτουργία του μυελού των οστών θα μπορούσε να είναι επικίνδυνη για την ίδια τη ζωή.<sup>10</sup>

Συγκεκριμένα ο μυελός των οστών καταλαμβάνει τους χώρους μεταξύ των δοκίδων της σπογγώδους μοίρας των οστών (εικ.6). Μακροσκοπικά, ανάλογα με την εμφάνισή τους έχουν περιγραφεί δύο τύποι: ο **ερυθρός ή ενεργός μυελός των οστών**, που το χρώμα του οφείλεται στην παρουσία πολλών ερυθροκυττάρων και των πρόδρομων μορφών τους (εικ.7) και ο **κίτρινος μυελός των οστών**, πλούσιος σε λιποκύτταρα, που δεν παράγει κύτταρα του αίματος (~50% του μυελού των οστών στους ενήλικες είναι κίτρινος). Ο κίτρινος μυελός των οστών διατηρεί το αιμοποιητικό του δυναμικό. Έτσι, σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε περιπτώσεις σοβαρής αιμορραγίας, υποξυγοναιμίας ή υπερβολικής καταστροφής ερυθροκυττάρων, ο κίτρινος μυελός των οστών μπορεί επαγωγικά να μετατραπεί σε ερυθρό μυελό των οστών. Στα νεογνά όλος ο μυελός των οστών είναι ερυθρός, αλλά από το 6ο έτος της ηλικίας σταδιακά αντικαθίσταται από κίτρινο μυελό των οστών. Έως το 10ο έτος της ηλικίας ο ερυθρός μυελός των οστών βρίσκεται στους σπονδύλους, στις πλευρές, στο κρανίο, στην πύελο και στα κεντρικά τμήματα του μηριαίου και του βραχιονίου οστού. Στους ενήλικες η παραγωγή των κυττάρων του αίματος από το μυελό των οστών επαρκεί για τις φυσιολογικές ανάγκες του οργανισμού.<sup>41</sup>



ΕΙΚΟΝΑ 6. Φωτομικρογραφία απασβεστομένου οστού που δείχνει τον αιμοποιητικό μυελό των οστών (Α) στους χώρους μεταξύ των οστικών δοκίδων (Δ). Μερικές περιοχές του μυελού καταλαμβάνονται από λιποκύτταρα (Λ). Χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Μεσαία μεγέθυνση. ([http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus\\_I/aimopiisi/aimopiisi/mielos/index.htm#](http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_I/aimopiisi/aimopiisi/mielos/index.htm#))

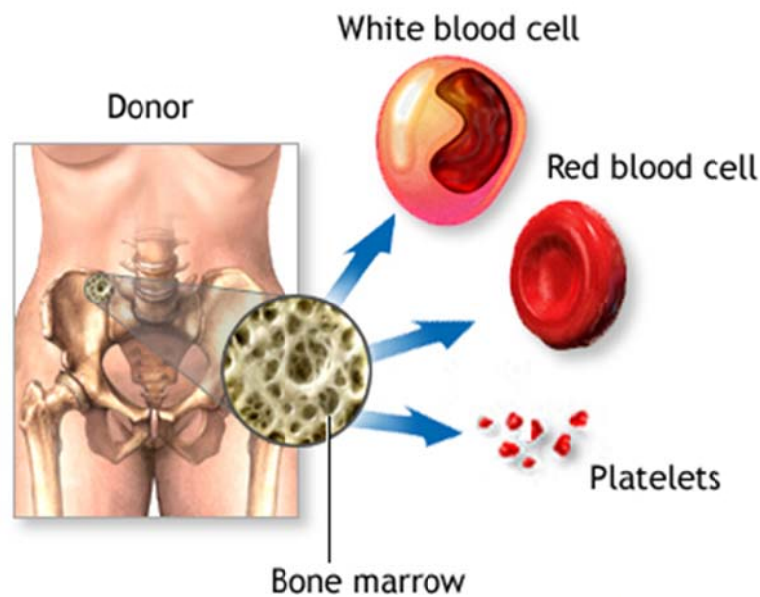


τον  
τη  
m#)

**Εξωμυελική αιμοποίηση σε ασθένειες:** Στους ενήλικες η ερυθροποίηση, κοκκιοκυτταροποίησης και θρομβοποίηση σε περιοχές εκτός του μυελού των οστών θεωρείται μη φυσιολογική. Όταν ο μυελός των οστών νοσεί και δεν μπορεί να ανταποκριθεί στις ανάγκες του οργανισμού για το σχηματισμό νέων κυττάρων του αίματος, το ήπαρ, ο σπλήνας ή οι λεμφαδένες πιθανόν να αναλάβουν εκ νέου την εμβρυϊκή αιμοποιητική τους δραστηριότητα.<sup>41</sup>

### **Ερυθρός μυελός των οστών**

Ο ερυθρός μυελός των οστών αποτελείται από διακλαδιζόμενα **τριχοειδικά κολλοειδή** και **δικτυωτό υπόστρωμα**. Οι διάμεσοι χώροι ανάμεσα στα κολλοειδή καταλαμβάνονται από τις **αιμοποιητικές χορδές**, που περιέχουν αρχέγονα και πρόδρομα κύτταρα του αίματος, τα οποία βρίσκονται σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης και ωρίμανσης. Το δικτυωτό υπόστρωμα, που αποτελεί ένα πλέγμα στήριξης των αιμοποιητικών κυττάρων, αποτελείται από ένα τρισδιάστατο δίκτυο **δικτυωτών κυττάρων** με κυτταρολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια των ινοβλαστών και από ένα λεπτό πλέγμα δικτυωτών ινών.<sup>41</sup>



## Γ.2. Από ιστολογική άποψη

Ο μυελός των οστών είναι η κύρια θέση αιμοποίησης και αποτελείται από διακλαδιζόμενα τριχοειδικά κολποειδή και από ένα δικτυωτό υπόστρωμα. Οι διάμεσοι χώροι ανάμεσα στα κολποειδή είναι γεμάτοι με αιμοποιητικά κύτταρα.

Επιπρόσθετα ο μυελός των οστών μαζί με το σπλήνα και το ήπαρ εκτός από την αιμοποιητική λειτουργία, διαθέτει ακίνητα μακροφάγα που απομακρύνουν από την κυκλοφορία τα γηρασμένα και ελαττωματικά κύτταρα του αίματος, με τη λειτουργία της φαγοκυττάρωσης. Στα μακροφάγα αποθηκεύεται επίσης ο σίδηρος που προέρχεται από την αποδόμηση της αιμοσφαιρίνης. Τέλος, ο μυελός των οστών συμμετέχει ενεργά στο ανοσοποιητικό σύστημα, διότι αποτελεί τη θέση ωρίμανσης των Β λεμφοκυττάρων.<sup>10,15, 41</sup>

### **Β Λεμφοκύτταρα.**

Κύτταρα του ανοσιακού –αμυντικού- συστήματος, που έχουν εξειδικευθεί στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών. Τα Β-λεμφοκύτταρα αντιπροσωπεύουν περίπου το 5-15% των κυκλοφορούντων στο αίμα λεμφοκυττάρων και ταυτοποιούνται από την

παρουσία ενδογενώς παραγομένων αντισωμάτων, τα οποία, μετά το σχηματισμό τους καθιλώνονται στην κυτταρική μεμβράνη του λεμφοκυττάρου και δεν εκκρίνονται. Η ενδομυελική τους ωρίμανση είναι ανεξάρτητη από την παρουσία αντιγόνων. Η πλειονότητα των κυκλοφορούντων στο αίμα Β-λεμφοκυττάρων φέρουν προσηλωμένα στην επιφάνειά τους μόρια IgM και IgD. Πολύ λίγα από τα κυκλοφορούντα κύτταρα φέρουν επιφανειακά προσηλωμένες ανοσοσφαιρίνες τύπου G, A ή E, αν και παρόμοια κύτταρα σχηματίζουν μεγάλες συναθροίσεις σε ειδικούς τόπους του οργανισμού. Πχ., κύτταρα με επιφανειακή IgA απαντούν στο έντερο και τους πνευμονικούς ιστούς. Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και άλλων τύπων κύτταρα που φέρουν στην επιφάνειά τους ανοσοσφαιρίνες, προσηλωμένες μέσω ειδικών Fc υποδοχέων.<sup>11</sup>

Κάθε Β-κύτταρο διαθέτει υποδοχείς για ένα -συγκεκριμένο- τύπο αντιγόνου, απέναντι στο οποίο εμφανίζει ειδικότητα για όλη τη διάρκεια της ζωής του. Τα Β-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται όταν συναντήσουν το ορισμένο για κάθε κύτταρο αντιγόνο, παρουσία βοηθητικών κυττάρων (πχ., των επικουρικών ή κατασταλτικών Τ-κυττάρων). Αυτή η κλωνική επιλογή, μέσω της αντιγονικής αναγνώρισης συνεπάγεται την επέκταση των ειδικών κλώνων. Στη συνέχεια διαφοροποιούνται δύο ομάδες κυττάρων. Τα παράγοντα αντισώματα κύτταρα και τα κύτταρα μνήμης. Τα τελευταία, κυρίως, κύτταρα κυκλοφορούν στους ιστούς και τα λεμφικά όργανα, μέσω του αίματος και του θωρακικού πόρου και εκτελούν έλεγχο των ιστών του σώματος για ενδεχόμενη εισβολή του αντιγόνου, που μπορούν να αναγνωρίσουν.<sup>11</sup>

Σύμφωνα με τη θεωρία της επιλογής των κλώνων, τα Β-λεμφοκύτταρα του οργανισμού διαθέτουν ειδικούς αντιγονικούς -Ig -υποδοχείς πριν από την έκθεσή τους σε ένα αντιγονικό ερέθισμα. Μετά τη σύνδεση των υποδοχέων με το αντιγόνο και τη συνεργασία των ρυθμιστικών -επικουρικών ή κατασταλτικών Τ-κυττάρων, συντελείται διαφοροποίηση προς πλασματοκύτταρα, από τα οποία εκκρίνονται πλέον αντισώματα του τύπου της Ig του υποδοχέως, που αρχικά συνέδεσε το αντιγόνο. Ενώ, στην ουσία, όλο το ποσό των αντισωμάτων που εκκρίνεται από τα πλασματοκύτταρα εκκρίνεται στο περιβάλλον, το 90% των αντισωμάτων που παράγονται στα Β-κύτταρα εντοπίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου σαν ειδικοί Ig υποδοχείς.<sup>11</sup>

## Αγγείωση

Ο μυελός των οστών αιματώνεται από τους μυελικούς κλάδους της **τροφοφόρου αρτηρίας** του οστού, η οποία αφού διαπεράσει το φλοιό διαμέσου ενός «θρεπτικού καναλιού», διακλαδίζεται σε μια σειρά αγγείων που εφοδιάζουν με αίμα τόσο το φλοιακό, όσο και το μυελικό οστό. Η αγγείωση αυτή εμπλουτίζεται με μικρότερα αγγεία με προέλευση από το μυϊκό ιστό και το περίοστεο και τα οποία διαπερνούν με παρόμοιο τρόπο το φλοιό. Το τριχοειδικό δίκτυο αποτελείται από κολποειδή με λεπτά τοιχώματα, που καταλήγουν σε έναν κεντρικό κόλπο, ο οποίος εκβάλλει στην εκφορητική φλέβα, που εξέρχεται από το ίδιο θρεπτικό κανάλι.<sup>41</sup>

Τα κολποειδή του μυελού των οστών σχηματίζονται από μια στιβάδα θυριδωτών ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία επικάθονται σε μια ασυνεχή βασική μεμβράνη. Το κυτταρόπλασμα σε μερικά σημεία είναι τόσο λεπτό ώστε ο ενδοθηλιακός φραγμός είναι λίγο παχύτερος από το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης του ενδοθηλίου. Τα ώριμα κύτταρα προσκολλώνται στο κολποειδικό ενδοθήλιο του μυελού πριν απελευθερωθούν στην κυκλοφορία. Η μετανάστευση των ώριμων κυττάρων από το μυελό των οστών στην κυκλοφορία ρυθμίζεται από **απελευθερωτικούς παράγοντες**, που παράγονται ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Έχουν περιγραφεί αρκετές τέτοιες ουσίες, όπως ο παράγοντας C3 του **συμπληρώματος** (μια σειρά ανοσολογικά ενεργών πρωτεϊνών του αίματος), διάφορες ορμόνες (γλυκοκορτικοειδή και ανδρογόνα) και μερικές βακτηριακές τοξίνες.<sup>41</sup>

## Μικροπεριβάλλον και αυξητικοί παράγοντες

Η αιμοποίηση εξαρτάται από τις κατάλληλες συνθήκες του **μικροπεριβάλλοντος** του μυελού των οστών και από την παρουσία των **αυξητικών παραγόντων**.<sup>41</sup>

Οι κατάλληλες συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος δημιουργούνται από τα κύτταρα του υποστρώματος των αιμοποιητικών οργάνων, τα οποία παράγουν επαρκή ποσότητα εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τα κύτταρα του υποστρώματος είναι σημαντικά για τον έλεγχο της διαφοροποίησης και ωρίμανσης των αιμοποιητικών

κυττάρων. Σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση παίζουν οι διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναπτυσσόμενων κυττάρων του αίματος και του υποστρώματος των αιμοποιητικών οργάνων. Η διεργασία αυτή δεν είναι πλήρως κατανοητή και τα μηνύματα (σηματοδοτικά μόρια) που μεσολαβούν στις διακυτταρικές επαφές είναι άγνωστα προς το παρόν. Επίσης είναι πολύ σημαντικές για την αιμοποίηση οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων.<sup>41</sup>

Ο καλύτερα κατανοητός μηχανισμός ελέγχου της αύξησης των διαφόρων τύπων αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων περιλαμβάνει τη δράση των αυξητικών παραγόντων. Τα προγονικά και τα πρόδρομα κύτταρα δεν είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν χωρίς τη συνεχή διέγερσή τους. Η ενεργοποίησή τους εξαρτάται, αφενός μεν από την επαφή τους με τα κύτταρα του υποστρώματος και από τα σηματοδοτικά μόρια που απελευθερώνονται από αυτά (τα στρωματικά κύτταρα) και αφετέρου από τους **αιμοποιητικούς αυξητικούς παράγοντες**, που είναι επίσης γνωστοί ως **αιμοποιητικές κυτοκίνες**. Αυτές οι ουσίες είναι γλυκοπρωτεΐνες και παράγονται στο μυελό των οστών από τα **δικτυωτά κύτταρα του στρώματος**, τα **μακροφάγα**, τα **ενδοθηλιακά κύτταρα** και τα **αναπτυσσόμενα λεμφοκύτταρα**. Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες σχηματίζονται επίσης και εκτός του μυελού των οστών (εικ.9).<sup>41</sup>

Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων:

- **Διεγερτικοί παράγοντες αποικιών ( Colony - stimulating factors - CSF ).**

(Ονομάζονται έτσι γιατί διεγείρουν τα προγονικά κύτταρα να σχηματίζουν *in vitro* αποικίες κυττάρων).

- **Ερυθροποιητίνη και θρομβοποιητίνη**

- **Ιντερλευκίνες** Παράγονται από τα λευκοκύτταρα (κυρίως από τα λεμφοκύτταρα) και επηρεάζουν άλλα λευκοκύτταρα (παρακρινής μηχανισμός) ή τα ίδια τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται (αυτοκρινής μηχανισμός).<sup>41</sup>



Οι αυξητικοί αυτοί παράγοντες εκκρίνονται συστηματικά ή τοπικά και ελέγχουν τρεις πλευρές της κυτταρικής αύξησης:

- Τον πολλαπλασιασμό
- Τη διαφοροποίηση
- Την ωρίμανση

Είναι προφανές ότι κάθε παράγοντας έχει περισσότερο από μία δραστηριότητα, αφού μερικοί δρουν συνεργικά, για να προωθήσουν μια ειδική πλευρά της κυτταρικής ανάπτυξης. Πολλές από αυτές τις ουσίες τώρα μπορούν να παραχθούν συνθετικά και χρησιμοποιούνται στη θεραπεία νόσων του αίματος.<sup>41</sup>

Κύρια χαρακτηριστικά των πέντε καλύτερα γνωστών αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων (ουσίες σχηματισμού αποικιών).		
Όνομα	Γονιδιακός εντοπισμός στον άνθρωπο και κύτταρα προέλευσης	Κυρία βιολογική δράση
Παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (G-CSF)	Χρωμόσωμα 17 Μακροφάγα Ενδοθήλιο Ινοβλάστες	Ενεργοποιεί (in vivo και in vitro) το σχηματισμό κοκκιοκυττάρων Αυξάνει το μεταβολισμό των κοκκιοκυττάρων Ενεργοποιεί τα νεοπλασματικά (λευχαιμικά) κύτταρα
Παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων (GM-CSF)	Χρωμόσωμα 5 T λεμφοκύτταρα Ενδοθήλιο Ινοβλάστες	Ενεργοποιεί in vivo και in vitro το σχηματισμό των κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων
Παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων (M-CSF)	Χρωμόσωμα 5 Μακροφάγα Ενδοθήλιο Ινοβλάστες	Ενεργοποιεί το σχηματισμό μακροφάγων in vitro, αυξάνει την αντινεοπλασματική δραστηριότητα των μακροφάγων
Ιντερλευκίνη 3 (IL-3)	Χρωμόσωμα 5 T λεμφοκύτταρα	Ενεργοποιεί in vivo και in vitro την παραγωγή όλων των κυττάρων της μυελικής σειράς
Ερυθροποιητίνη (EPO)	Χρωμόσωμα 7 Διάμεσα κύτταρα του νεφρού (έξω μοίρα του φλοιού).	Διεγείρει το σχηματισμό των ερυθροκυττάρων in vivo και in vitro

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η δράση των CSFs σε επείγουσες περιπτώσεις, όπως π. χ. στις βακτηριακές μολύνσεις. Σε περιοχές που παρατηρείται κάποια μόλυνση από παθογόνο-εισβολέα, οι βακτηριακές τοξίνες άμεσα ενεργοποιούν τα γονίδια των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των T λεμφοκυττάρων

συνδεδεμένων με αντιγόνο για τη σύνθεση των CSFs. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των CSFs με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η παραγωγή των κυτταρικών τύπων υπεύθυνων για την άμυνα του οργανισμού έναντι των βακτηρίων. Μερικοί CSFs (π. χ. GM - CSF ) δρουν ως χημειοτακτικές ουσίες και προσελκύουν ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και ηωσινόφιλα στη περιοχή της βακτηριακής μόλυνσης, αυξάνοντας έτσι τη λειτουργική δραστηριότητα των κυττάρων αυτών.<sup>41</sup>

## **Γ.3. ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

### **Γ.3.1. Λευκοκύτταρα**

Υπάρχουν πέντε τύποι λευκοκυττάρων: τα λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα (ονομάζονται και κοκκιοκύτταρα)ή πολυμορφοπύρηνα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα και τα μονοκύτταρα. Κάθε τύπος παίζει διαφορετικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού από λοιμώξεις. Τα ουδετερόφιλα, βασεόφιλα και εωζινόφιλα θανατώνουν και μεταβολίζουν τα βακτήρια. Τα μονοκύτταρα ενδοκυτταρώνουν επίσης τα βακτήρια, αλλά παράγονται πιο γρήγορα από τα ουδετερόφιλα και τείνουν να ζουν πιο πολύ. Τα λεμφοκύτταρα υπάρχουν στο αίμα και το λεμφικό σύστημα. Υπάρχουν δύο τύποι λεμφοκυττάρων: τα T- και τα B-λεμφοκύτταρα. Τα T-λεμφοκύτταρα που ωριμάζουν στο θύμο αδένα, βοηθούν τον οργανισμό στη διάκριση του εαυτού του από το μη εαυτό. Τα B-λεμφοκύτταρα, που κυκλοφορούν στο αίμα παράγουν αντισώματα – πρωτεΐνες που προσδέονται σε συγκεκριμένα αντιγόνα.<sup>12</sup>

### **Γ.3.2. Ερυθροκύτταρα**

Τα ερυθροκύτταρα έχουν σχήμα κυκλικού αμφίκιουλου δίσκου. Αυτά τα κύτταρα ενσωματώνουν σίδηρο (Fe) σε μια πρωτεΐνη αίμης, την αιμογλοβίνη ή αιμοσφαιρίνη. Η αιμογλοβίνη επιτρέπει στα ερυθροκύτταρα να μεταφέρουν οξυγόνο στους ιστούς σε όλο το σώμα.<sup>12</sup>

### **Γ.3.3. Αιμοπετάλια (Θρομβοκύτταρα)**

Τα αιμοπετάλια είναι κλάσματα κυττάρων, των μεγακαρυοκυττάρων.

Ο οργανισμός χρησιμοποιεί τα αιμοπετάλια στη διαδικασία της πήξης του αίματος για την επούλωση αγγείων και για να ενεργοποιήσει άλλους παράγοντες πήξης.<sup>12</sup>

## **Γ.4. ΑΙΤΙΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Ασθένειες ή καταστάσεις, οι οποίες δημιουργούν διαταραχές στην παραγωγή οποιασδήποτε σειράς ώριμων κυττάρων του αίματος ή άωρων προγονικών κυττάρων, μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στο μυελό των οστών. Υπάρχει ποικιλία στις αιτίες που είναι υπεύθυνες για αυτό:

- η υπερπαραγωγή ενός τύπου κυττάρων, που αυξάνονται πολύ και η οποία οδηγεί σε υποπαραγωγή όλων των υπόλοιπων κυτταρικών τύπων
- η παραγωγή παθολογικών κυττάρων, τα οποία δεν ωριμάζουν ή δε λειτουργούν σωστά
- η συμπίεση κυττάρων, η οποία προκαλείται από υπερανάπτυξη του δικτύου του υποστηρικτικού ινώδους ιστού και καταλήγει σε ελαττωμένο αριθμό κυττάρων με πολλά κύτταρα παθολογικού σχήματος
- μία κυτταρική σειρά που γίνεται κυρίαρχη επειδή τα κύτταρα δεν πεθαίνουν με φυσιολογικό ρυθμό
- η μείωση της παραγωγής των κυττάρων ή η γρήγορη απώλειά τους επειδή είναι ευαίσθητα
- η ανεπαρκής διαθεσιμότητα σιδήρου (Fe) για να δημιουργηθούν φυσιολογικά ερυθροκύτταρα (αυτά που τελικά παράγονται ονομάζονται μικροκυτταρικά)
- ασθένειες, οι οποίες μπορεί να εξαπλωθούν στο μυελό των οστών, επηρεάζοντας έτσι την παραγωγή και την ωρίμανση των κυττάρων.<sup>12</sup>

### **Γ.4.1. Οι διαταραχές**

Η λευχαιμία είναι μια κακοήθεια των λευκοκυττάρων που μπορεί να επηρεάσει οποιονδήποτε από τους πέντε τύπους λευκοκυττάρων. Όλα ξεκινούν με ένα παθολογικό κύτταρο που αρχίζει να πολλαπλασιάζεται (κλωνοποιείται) ασταμάτητα. Τα νεοδημιουργηθέντα λευχαιμικά κλωνικά κύτταρα δεν λειτουργούν σωστά.<sup>12</sup>

Δεν καταπολεμούν τις λοιμώξεις και όσο πληθαίνουν, αναστέλλουν την παραγωγή άλλων τύπων λευκοκυττάρων, ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων.<sup>12</sup>

Ασθενείς με λευχαμία παρουσιάζουν συχνές λοιμώξεις, εύκολη κόπωση, αιμορραγίες, μώλωπες, αναιμία, νυχτερινές εφιδρώσεις και πόνους στα οστά και τις αρθρώσεις. Ο σπλήνας, που διηθεί το αίμα και απαλλάσσει την κυκλοφορία από γερασμένα κύτταρα, μεγαλώνει σε μέγεθος, όπως ίσως και το ήπαρ και οι λεμφαδένες.<sup>12</sup>

Οι μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές (MPD – myeloproliferative disorders) είναι ομάδα νόσων που εστιάζουν στο μυελό των οστών και χαρακτηρίζονται από υπερπαραγωγή μιας προγονικής μορφής (άωρης μορφής) ενός κυττάρου του μυελού των οστών. Όταν υπάρχει ανάγκη για ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρου του αίματος, αδιαφοροποίητα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών αρχίζουν να αλλάζουν, μεταβαλλόμενα στον άωρο βλαστικό τύπο κυττάρου που έχει ανάγκη ο οργανισμός. Αυτοί οι βλάστες διαφοροποιούνται στη συνέχεια για να δώσουν ένα από τους πέντε τύπους των λευκοκυττάρων, ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια. Ο μυελός των οστών περιέχει συνήθως ένα ετερογενή πληθυσμό κυττάρων, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης, αφού μόνο ώριμα κύτταρα αφήνουν τον μυελό για να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος.<sup>12</sup>

Στις περιπτώσεις μυελοϋπερπλαστικών διαταραχών, υπερβολική παραγωγή ενός άωρου τύπου κυττάρων προκαλεί αύξηση στον αριθμό των ώριμων κυττάρων αυτού του τύπου και αύξηση ή μείωση άλλων τύπων αιμοκυττάρων, τα οποία μπορεί να ανασταλούν ή να αυξηθούν υπέρμετρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα συμπτώματα που σχετίζονται με υπερπαραγωγή και ελλείψεις αιμοκυττάρων, καθώς και δυσλειτουργίες σε όλο το σώμα.<sup>12</sup>

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS) είναι μια ομάδα νόσων που χαρακτηρίζονται από παθολογική παραγωγή κυττάρων του μυελού των οστών. Στις περιπτώσεις μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου συχνά δεν παράγεται επαρκής αριθμός αιμοκυττάρων. Αυτό οδηγεί σε αναιμία, λοιμώξεις, υπερβολικές αιμορραγίες και μώλωπες. Τα σύνδρομα αυτά κατατάσσονται ανάλογα με το πώς τα κύτταρα του μυελού και του αίματος φαίνονται κάτω από το μικροσκόπιο και συμπεριλαμβάνουν: διάφορους τύπους αναιμίας, που δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία (ανθεκτικοί),

μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, που σχετίζεται με διαταραχές στα χρωμοσώματα και αταξινόμητα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.<sup>12</sup>

Με το πέρασ του χρόνου, τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα τείνουν να εξελιχθούν σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.<sup>12</sup>

Η απλαστική αναιμία σχετίζεται με απώλεια προγονικών κυττάρων (συνήθως ερυθροκυττάρων) εξαιτίας βλαβών στα αρχέγονα κύτταρα από τα οποία παράγονται ή τραυματισμού στο περιβάλλον του μυελού των οστών.<sup>12</sup>

Μερικές απλαστικές αναιμίες προκαλούνται από έκθεση σε χημικά, όπως το βενζόλιο, ακτινοβολία ή φάρμακα. Κάποια περιστατικά οφείλονται σε σπάνιες γενετικές ανωμαλίες, όπως η αναιμία Fanconi ή σε οξεία ιογενή λοίμωξη, όπως ο ανθρώπινος παρβοϊός. Η αιτία για τις μισές περιπτώσεις απλαστικών αναιμιών είναι άγνωστη.<sup>12</sup>

Άλλες διαταραχές περιλαμβάνουν:

- διαταραχές πλασματοκυττάρων, μία ομάδα καταστάσεων, που σχετίζονται με υπερπαραγωγή ενός κλώνου Β-λεμφοκυττάρων και της πρωτεΐνης-αντισώματός του
- Λεμφώματα και άλλους καρκίνους που εξαπλώνονται στο μυελό των οστών και επηρεάζουν την παραγωγή των κυττάρων
- Αναιμίες που προκαλούνται από ανεπάρκειες (π.χ. σιδήρου) και/ή αιμοσφαιρινοπάθειες που οδηγούν σε παραμορφωμένα ερυθροκύτταρα
- Αναιμίες που προκαλούνται από ανεπάρκεια ή δυσλειτουργία της ερυθροποιητίνης, μιας χημικής ουσίας, που παράγεται στα νεφρά και ρυθμίζει την παραγωγή ερυθροκυττάρων.<sup>12</sup>

## **Γ.5. ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

### **Γ.5.1. Γενική αίματος**

Αυτή είναι μια εξέταση ρουτίνας που ζητείται για να μετρηθούν ο απόλυτος αριθμός και η σχετική αναλογία κάθε τύπου κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος. Δίνει πληροφορίες στο γιατρό για το μέγεθος, το σχήμα και το βαθμό ωρίμανσης των παρόντων ερυθροκυττάρων καθώς και των υπολοίπων κυττάρων του αίματος. Η γενική αίματος αποτελεί στιγμιότυπο του τι συμβαίνει στον οργανισμό τη στιγμή που λαμβάνεται το δείγμα του αίματος. Χρησιμοποιείται για να ανιχνευθούν

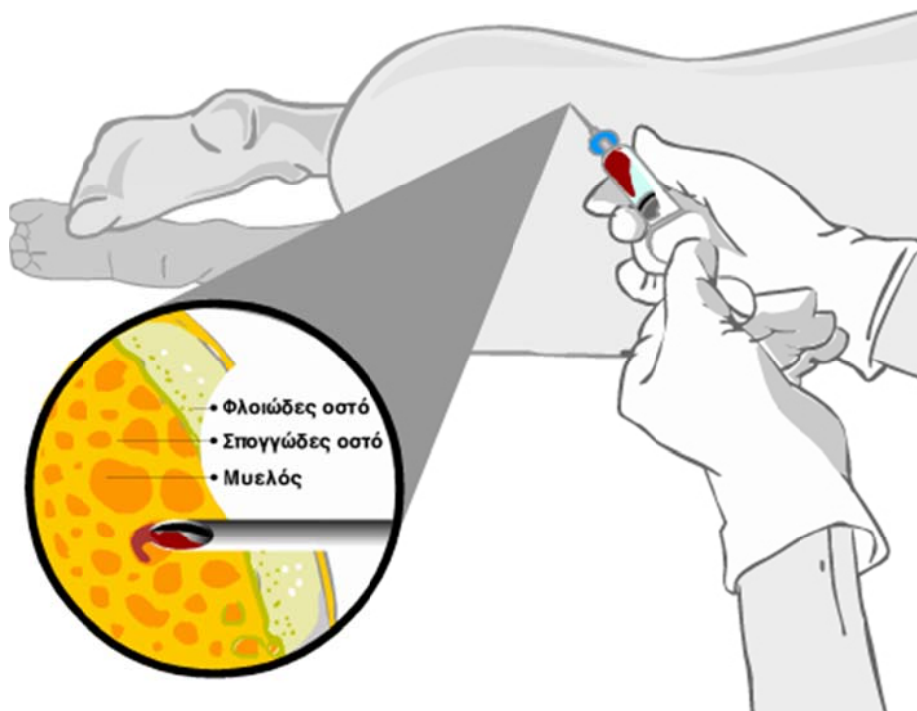
κυτταρικές ανωμαλίες, να καθοριστεί η σημασία τους, να βοηθηθεί η διάγνωση των αιτιών που τις προκαλούν και να παρακολουθηθούν η πορεία και η ανταπόκρισή τους στη θεραπεία. Διαταραχές στον αριθμό των κυττάρων, όπως αυξημένα λευκοκύτταρα ή μειωμένα ερυθροκύτταρα, μπορεί να οφείλονται σε διαταραχές του μυελού των οστών, αλλά μπορεί και να είναι αποτέλεσμα άλλων περιστασιακών ή χρόνιων παθήσεων. <sup>12</sup>

### **Γ.5.2. Αναρρόφηση/Βιοψία μυελού των οστών**

Αν ο γιατρός υποψιάζεται διαταραχή του μυελού των οστών, καταφεύγει στη βιοψία μυελού των οστών για να διαπιστώσει πραγματικά την κατάσταση των κυττάρων και του ιστού στο μυελό(εικ.10). <sup>12</sup>

Όταν ο εργαστηριακός εξετάζει το δείγμα από το μυελό των οστών στο μικροσκόπιο μπορεί να δει τον αριθμό, το μέγεθος και το σχήμα των προγονικών κυττάρων των ερυθροκυττάρων, λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων (μεγακαρυοκύτταρα), να καθορίσει τις αναλογίες των ώριμων και άωρων κυττάρων, να δει οποιαδήποτε αύξηση του ινώδους ιστού και να ανιχνεύσει καρκινικά κύτταρα που πιθανόν υπάρχουν στο μυελό. Η πλειονότητα των διαταραχών του μυελού μπορούν να ανιχνευθούν με αυτή την εξέταση. <sup>12</sup>

Οι αποθήκες σιδήρου (Fe) μπορούν επίσης να εκτιμηθούν με εξέταση του μυελού των οστών, αν και η ανεπάρκεια Fe μελετάται συνήθως με άλλες εξετάσεις Fe. <sup>12</sup>



**ΕΙΚΟΝΑ10.** Η διαδικασία της αναρρόφησης του μυελού.  
[\(http://www.mycmlife.eu/gr/understanding\\_cml/further\\_information/bone\\_marrow/\)](http://www.mycmlife.eu/gr/understanding_cml/further_information/bone_marrow/)

### **Γ.5.3. Κυτταρομετρία ροής**

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική με την οποία προσδιορίζεται το DNA και τα αντιγόνα που βρίσκονται στην επιφάνεια και το εσωτερικό των κυττάρων από το μυελό των οστών, το περιφερικό αίμα και άλλα βιολογικά υγρά. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων σε εναιώρημα μετά την κατάλληλη επισήμανσή τους με φθορίζοντα αντισώματα. Ένα μηχάνημα που ονομάζεται κυτταρομετρητής ροής χρησιμοποιείται στη συνέχεια για να μετρήσει και να εξετάσει τα κύτταρα για κυτταρικές μορφολογικές ανωμαλίες.<sup>12</sup>

### **Γ.5.4. Γενετικές εξετάσεις**

Αυτές οι εξετάσεις μελετούν διαφορετικού τύπου γενετικές διαταραχές σε κύτταρα του μυελού των οστών και λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος συμπεριλαμβανομένων:

- χρωμοσωμικών μετατοπίσεων, στις οποίες τμήμα ενός χρωμοσώματος μετατοπίζεται σε άλλη θέση, συχνά ενός άλλου χρωμοσώματος. Συσχετίζονται με χρόνιες μυελογενείς λευχαιμίες, λέμφωμα του Burkitt και άλλες λευχαιμίες και λεμφώματα.

- μονογονιδιακών αλλαγών, που παρατηρούνται σε μερικά λεμφώματα και διαταραχές αιμοσφαιρίνης.
- κλωνικών πληθυσμών λευκοκυττάρων, όπου παράγονται πολλά αντίγραφα ενός συγκεκριμένου λευκοκυττάρου. Αυτά παρέχουν αρκετές διαγνωστικές ενδείξεις για ποικίλα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και λεμφοειδείς λευχαιμίες.<sup>12</sup>

Οι τεχνικές περιλαμβάνουν την απομόνωση του DNA από ένα συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό στο μυελό των οστών ή το αίμα, τον κατάλληλο χειρισμό του για την εύρεση του σωστού γονιδίου και τέλος τη χρήση ειδικών δοκιμασιών που ψάχνουν για μία από τις διαταραχές που αναφέρθηκαν παραπάνω στα μεμονωμένα γονίδια.<sup>12</sup>

### **Γ.5.5. Οσφυϊκή παρακέντηση**

Αν η λευχαιμία βρεθεί στο μυελό των οστών, τότε μπορεί να πραγματοποιηθεί οσφυϊκή παρακέντηση από το γιατρό για να ψάξει για λευχαιμικά κύτταρα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.<sup>12</sup>

### **Γ.5.6. Μη-εργαστηριακές εξετάσεις**

Πολλές φορές πραγματοποιούνται ακτινογραφίες για να αναζητηθούν σημάδια που σχετίζονται με ορισμένες ασθένειες του μυελού των οστών, όπως μάζες κυττάρων σε περιοχές όπως το στέρνο, ο σπλήνας και το ήπαρ.<sup>12</sup>

## **Γ.6. ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**

Οι διαταραχές του μυελού των οστών συνήθως δεν μπορούν να αποφευχθούν. Κάποιες είναι αποτέλεσμα έκθεσης σε χημικά, εξαιτίας προηγούμενων θεραπειών με ακτινοβολία, ή αποτέλεσμα σπάνιων γενετικών ανωμαλιών, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις η αιτία είναι άγνωστη. Η θεραπεία εξαρτάται από τον τύπο της διαταραχής του μυελού, από τη σοβαρότητά της και τα συμπτώματα που εμφανίζονται. Γι' αυτό τον λόγο πολλές φορές η θεραπεία αλλάζει στο χρόνο. Η οξεία λευχαιμία των λευκοκυττάρων είναι μερικές φορές θεραπεύσιμη, αλλά άλλες διαταραχές του μυελού δεν είναι. Οι λευχαιμίες αντιμετωπίζονται με χημειοθεραπεία ή ακτινοβολίες. Ο στόχος της θεραπείας αυτής είναι να οδηγήσει τη νόσο σε ύφεση και, αν είναι δυνατόν, να σκοτώσει όλα τα παθολογικά κύτταρα του



αίματος έτσι ώστε να επιτραπεί στα φυσιολογικά να αναπαραχθούν και να επαναφέρουν τη σωστή λειτουργία του αίματος.<sup>12</sup>

Η θεραπεία των διαταραχών του μυελού των οστών περιλαμβάνει επίσης θεραπείες για ανακούφιση από τα συμπτώματα. Αυτές περιλαμβάνουν μεταγγίσεις αίματος αν υπάρχει αναιμία ή αφαίμαξη (με φλεβοτομή) αν ο μυελός παράγει υπερβολικό αριθμό ερυθροκυττάρων. Μπορεί ακόμα να είναι απαραίτητη μετάγγιση αιμοπεταλίων για να τεθεί η αιμορραγία υπό έλεγχο, ενώ απομάκρυνση αιμοπεταλίων από το αίμα (αιμοπεταλιαφαίρεση για να φιλτραριστούν τα αιμοπετάλια) μπορεί να χρειαστεί σε περιπτώσεις υπερβολικής παραγωγής τους από τον οργανισμό.<sup>12</sup>

Συχνές λοιμώξεις μπορεί να κάνουν απαραίτητη την αντιμικροβιακή θεραπεία του ασθενούς με χορήγηση ειδικών παραγόντων (παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων, παράγοντας διέγερσης μονοκυττάρων) για να διεγερθεί η παραγωγή των κοκκιοκυττάρων και των μονοκυττάρων. Οι ανεπάρκειες σιδήρου (Fe) μπορεί να απαιτούν συμπλήρωμα σιδήρου (Fe). Αν ο σπλήνας διογκωθεί επικίνδυνα, υπάρχει περίπτωση να πρέπει να αφαιρεθεί χειρουργικά.

Αν η πάθηση του μυελού είναι επιθετική και δεν ανταποκρίνεται στις θεραπείες, υποδεικνύεται η ανάγκη μεταμόσχευσης μυελού. Ο μυελός των οστών μπορεί να ληφθεί από τον ασθενή, να «καθαριστεί» από παθολογικά κύτταρα και να καταψυχθεί για να επαναισαχθεί στον ασθενή μετά από κατάλληλη θεραπεία.

Μπορεί ακόμα να προέλθει από κατάλληλο δότη πιο συχνά από συγγενή.

Νέες θεραπείες για τις διαταραχές του μυελού των οστών αναδύονται από ερευνητικές και κλινικές δοκιμές. Οι ασθενείς καλό είναι να συζητούν με το γιατρό τους για τη βέλτιστη θεραπεία για την περίπτωσή τους.<sup>12</sup>

## Δ. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

### Δ.1. Εισαγωγή

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών (ΜΜΟ) για μερικές δεκαετίες εφαρμόζεται σαν θεραπεία εκλογής σε μερικά βαριά, θανατηφόρα συγγενή ή επίκτητα νοσήματα, κυρίως του αιμοποιητικού και του λεμφικού συστήματος. Η ιδέα της χρησιμοποίησης του μυελού των οστών στη θεραπεία νοσημάτων του αίματος είναι παλιά, μετά τη γνώση ότι ακτινοβολημένα πειραματόζωα με θανατηφόρα δόση ακτινοβολίας επιζούν μετά από τη χορήγηση ομοιογονιδιακών ή αλλογενών μυελικών κυττάρων τα οποία απεικονίζουν το μυελό του λήπτη.<sup>8</sup>

Η μεταμόσχευση του μυελού κατέχει ιδιαίτερη θέση ανάμεσα στις μεταμοσχεύσεις των διαφόρων οργάνων και ιστών, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του ιστού που μεταμοσχεύεται. Το μόσχευμα περιέχει τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, που η μεταμόσχευσή τους καταλήγει σε μία κατάσταση πλήρους αιμοποιητικής και λεμφικής χίμαιρας.<sup>8</sup>

Αυτό ευθύνεται τόσο για την απόρριψη της μεταμόσχευσης όσο και για την εμφάνιση μίας τυπικής αποκλειστικής αντίδρασης του μοσχεύματος κατά του ξενιστή, που οφείλεται στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων του μοσχεύματος από τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας του λήπτη. Ενώ η μεταμόσχευση μυελού είναι η πιο εύκολη από όλες τις μεταμοσχεύσεις, από τεχνική άποψη, εντούτοις θέτει τα περισσότερα κλινικά και εργαστηριακά προβλήματα, λόγω της αφθονίας των επιπλοκών της. Μία άλλη ιδιαιτερότητα της μεταμόσχευσης μυελού είναι ότι η αποκατάσταση των φυσιολογικών λειτουργιών γίνεται με αργό τρόπο, γεγονός που εξηγεί τη συχνότητα και τη βαρύτητα των ευκαιριακών λοιμώξεων μετά τη μεταμόσχευση μυελού καθώς και την ανάγκη λήψης προληπτικών μέτρων για την αποφυγή τους. Μετά την επιτυχή μεταμόσχευση, όλα τα κυτταρικά στοιχεία του αίματος προέρχονται από τον δότη.<sup>8</sup>

Αυτή η κατάσταση χίμαιρας είναι η απόδειξη μίας κατάστασης ανοσολογικής ανοχής, που, εφόσον εγκατασταθεί, είναι οριστική και δεν απαιτεί χορήγηση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων για να μην απορριφθεί το μόσχευμα.<sup>8</sup>

Η μεταμόσχευση μυελού είναι, είτε αυτόλογη, όταν ο μεταμοσχευόμενος μυελός έχει ληφθεί από τον ίδιο τον ασθενή, είτε αλλογενής, όταν ο δότης είναι άλλο άτομο, μέλος ή μη της οικογένειας του ασθενή. Ομογονιδιακή (συγγενική) μεταμόσχευση ονομάζεται όταν δότης και λήπτης είναι μονοωικοί δίδυμοι. Η αυτόλογη μεταμόσχευση επιφυλάσσεται για περιπτώσεις κακοήθων νόσων, όπου γίνεται δεκτό ότι δεν θα επαναχορηγηθούν κακοήθη κύτταρα με το μόσχευμα. Αυτό στην πράξη, είναι αρκετά δύσκολο να καθοριστεί και οι προσπάθειες για τη μείωση των νεοπλασματικών κυττάρων *in vivo* και *in vitro* δεν έδωσαν προς το παρόν καλά αποτελέσματα. Στην αλλογενή, όμως, μεταμόσχευση μυελού υπάρχει το πρόβλημα της παραμονής κακοήθους μάζας στο μυελό των ασθενών, παρά την πολύ έντονη θεραπεία προετοιμασίας, που ευθύνεται για τις υποτροπές που εμφανίζονται μετά τη μεταμόσχευση για κακοήθη νοσήματα.<sup>8</sup>

Παρά τις σημαντικές προόδους των τελευταίων δεκαετιών, ακόμα και σήμερα υπάρχουν προβλήματα που αφορούν τη φύση του υποκείμενου νοσήματος για το οποίο θα εφαρμοστεί η μεταμόσχευση και το σχήμα της θεραπείας προετοιμασίας που δίνεται ώστε να δημιουργηθεί ο κατάλληλος χώρος στο μυελό του λήπτη. Σκοπός είναι να εγκατασταθεί το μόσχευμα ώστε να εκριζωθεί το υποκείμενο νόσημα και να γίνει καλή εγκατάσταση του μοσχεύματος καθώς και να αντιμετωπιστούν τα ποικίλα προβλήματα των συνεπειών της ανάμιξης των διαφορετικών ανοσολογικών τύπων αντιδράσεων στις περιπτώσεις αλλογενούς μεταμόσχευσης. Σήμερα εκτός από τον μυελό των οστών, αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα συλλέγονται από το περιφερικό αίμα μετά από κατάλληλη διέγερσή τους, με αυξητικούς παράγοντες και από το αίμα του ομφαλίου λώρου.<sup>8,42</sup>

## **Δ.2. ΟΙ ΠΡΩΤΕΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Οι πρώτες μεταμοσχεύσεις αιμοποιητικών κυττάρων πραγματοποιήθηκαν μετά τα τέλη της δεκαετίας του 1950, όταν οι επιστήμονες μπόρεσαν να περιγράψουν τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA.<sup>8</sup>

Αρχικά, μεταμοσχεύσεις γίνονταν μόνο μεταξύ διδύμων αδελφών γιατί έτσι εξασφαλιζόταν η απόλυτη HLA συμβατότητα. Μόνο μετά το 1960, οπότε έγιναν γνωστά αρκετά στοιχεία για την HLA συμβατότητα, επιχειρήθηκαν μεταμοσχεύσεις και από συγγενείς που δεν ήταν ταυτόσημα δίδυμα αδέλφια.<sup>8</sup>

Τη δεκαετία του 1970 πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες μεταμοσχεύσεις από HLA συμβατούς μη συγγενείς δότες. Έως τότε είχε αποκτηθεί αρκετή εμπειρία με τις μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών και είχε καθοριστεί σε ποιους HLA τόπους απαιτείτο συμβατότητα. Τα HLA –A, –B και –DR ήταν απολύτως απαραίτητο να είναι ταυτόσημα μεταξύ δότη και λήπτη.<sup>8</sup>

Το 1990 ο Dr. E. Donnall Thomas βραβεύθηκε με το Βραβείο Νόμπελ Ιατρικής για την πρωτοποριακή δουλειά του στις μεταμοσχεύσεις και τις πολλές και επιτυχημένες προσπάθειές του τόσο σε κλινικό όσο και πειραματικό επίπεδο.<sup>8</sup>

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1970, ο Dr. Thomas είχε πραγματοποιήσει πάνω από 100 μεταμοσχεύσεις σε ασθενείς με απλαστική αναιμία και λευχαιμία χρησιμοποιώντας HLA –A, –B και –DR ταυτόσημα αδέλφια.<sup>8</sup>

### **Δ.3. Η ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Τα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα έχουν την ικανότητα της αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε κύτταρα της ερυθράς, μυελικής/μονοκυτταρικής, μεγακαρυοκυτταρικής και λεμφικής σειράς. Διακρίνονται έτσι από τα δεσμευμένα αιμοποιητικά κύτταρα που έχουν ήδη χάσει την ικανότητα τους για αυτοανανέωση και έχουν ακριβείς και περιορισμένες ικανότητες ανάπτυξης. Η εγκατάσταση διαρκούς αιμοποίησης μετά τη μυελοκαταστροφική θεραπεία προετοιμασίας εξαρτάται ουσιαστικά από τη μεταμόσχευση των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων που έχουν σαν αποτέλεσμα τη διαρκή επαναποίκιση του μυελού. Έτσι στην κλινική πράξη η ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση αυτών των κυττάρων είναι πολύ σημαντική. Τα τελευταία χρόνια η κλινική μεταμόσχευση έχει επηρεαστεί έντονα από προόδους στον τομέα της βιολογίας των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η βασική έρευνα στη βιολογία των αιμοποιητικών κυττάρων είχε σαν αποτέλεσμα την εισαγωγή των κυτταροκινών για την κινητοποίηση των αρχέγονων κυττάρων στην κλινική πράξη και την ανάπτυξη στρατηγικών καθαρισμού των και *ex vivo* καλλιέργειας και χειρισμών.<sup>2</sup>

### **Δ.4. ΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Αν και η διαδικασία της Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών είναι παρόμοια σε όλες τις περιπτώσεις, οι στόχοι εξαρτώνται από την υποκείμενη νόσο. Όταν υπάρχουν συγγενή νοσήματα του μυελού, η διαταραχή μπορεί να διορθωθεί όταν καταστραφεί ο μυελός με υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας και αντικατασταθεί από το φυσιολογικό μυελό του δότη. Τέτοια παραδείγματα είναι η βαριά συνδυασμένη ανοσολογική ανεπάρκεια, όπου μπορεί να εγκατασταθεί ένα φυσιολογικό ανοσολογικό σύστημα ακόμα και χωρίς προηγούμενη χορήγηση θεραπείας προετοιμασίας. Στην ομόζυγη β-μεσογειακή αναιμία, όπου υπάρχει παθολογική σύνθεση αιμοσφαιρίνης μπορεί να αποκατασταθεί η φυσιολογική σύνθεσή της με το μεταμοσχευμένο μυελό.<sup>2</sup>

Στη νόσο του Hurler, το ένζυμο που ανεπαρκεί μπορεί να αντικατασταθεί με το μεταμοσχευμένο αλλογενή μυελό των οστών.<sup>2</sup>

Η βαριά απλαστική αναιμία οποιασδήποτε αιτιολογίας έχει πολύ κακή πρόγνωση και στις περιπτώσεις που δεν απέδωσε η κλασική φαρμακευτική αγωγή για να αποκατασταθεί η αιμοποίηση, η μόνη ελπίδα είναι η αλλογενής ΜΜΟ.<sup>2</sup>

Ο μυελός των οστών είναι συνήθως η κύρια θέση εντόπισης της νόσου στις αιματολογικές κακοήθειες, όπου ο στόχος της ΜΜΟ είναι να εξαλειφθεί ο παθολογικός πληθυσμός στο μυελό μαζί με τα φυσιολογικά κύτταρα και στη συνέχεια να αντικατασταθεί με τον αλλογενή μυελό, ο οποίος καθώς αποκαθιστά το αιμοποιητικό σύστημα ασκεί και μία αντιλευχαιμική δράση.<sup>2</sup>

## **Δ.5. Η ΜΟΝΑΔΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Η προετοιμασία και η πραγματοποίηση της μεταμόσχευσης μυελού απαιτούν μία σειρά από πολύπλοκες διαδικασίες που πρέπει να εφαρμόζονται μόνο σε πολύ εξειδικευμένα κέντρα. Μία μονάδα μεταμόσχευσης μυελού είναι απαραίτητο να έχει αποστειρωμένα δωμάτια, ο αέρας διηθείται και ανανεώνεται συνεχώς καθώς και κοινά δωμάτια, όπου θα νοσηλεύονται οι ασθενείς πριν και μετά τη μεταμόσχευση, αφού προηγουμένως αποστειρωθούν κατάλληλα. Μία τέτοια μονάδα απαιτεί ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό εντελώς εξειδικευμένο στις συνθήκες νοσηλείας και τα προβλήματα αυτών των ασθενών, καθώς και βοήθεια από ψυχολόγο διαιτολόγο και φυσιοθεραπευτή. Ο ασθενής, κατά τη διάρκεια της νοσηλείας του, παραμένει στην περιοχή του θαλάμου που είναι στείρα και οι επισκέψεις των γιατρών και των νοσηλευτών είναι όσο το δυνατό λιγότερες υπό αυστηρά μέτρα ασηψίας, πράγμα που απαιτεί κατάλληλα οργανωμένη μονάδα αποστείρωσης του υλικού.<sup>2</sup>

Επίσης είναι σημαντική η καθημερινή φροντίδα του ασθενή δηλαδή:

1. Αποστείρωση του δέρματος με αντισηπτικά διαλύματα καθώς και αποστείρωση όλων των αντικειμένων που χρησιμοποιεί ο ασθενής.
2. Περιποίηση του στόματος με αντισηπτικά και αντιμυκητιακά διαλύματα.
3. Χορήγηση από το στόμα ενός συνδυασμού αντιβιοτικών, με σκοπό την αποστείρωση του πεπτικού σωλήνα καθώς και προληπτική χορήγηση φαρμάκων κατά των ιών και της τοξοπλάσμωσης.
4. Χορήγηση αποστειρωμένης τροφής ή και τροφής χωρίς γλουτεΐνη.
- 5 Εφαρμογή μόνιμου κεντρικού καθετήρα για την καθημερινή χορήγηση παρεντερικής διατροφής και των απαραίτητων φαρμάκων. <sup>2</sup>

Η μονάδα μεταμόσχευσης πρέπει, κατά προτίμηση, να στεγάζεται σε μεγάλο νοσοκομείο και είναι ανάγκη να συνεπικουρείται από:

1. Κέντρο ακτινοθεραπείας.
2. Αίθουσα χειρουργείου.
3. Εργαστήριο ιστοσυμβατότητας.
- 4.Κέντρο αιμοδοσίας.

Τα παραπάνω πρέπει να συμπληρώνονται από κατάλληλο εργαστήριο λοιμώξεων, ανοσολογικό, γενετικό κ.λπ. για την κατάλληλη παρακολούθηση και έγκαιρη διάγνωση των πολλαπλών λοιμωδών και ανοσολογικών επιπλοκών και μεταβολών που συνοδεύουν τη μεταμόσχευση. <sup>2</sup>

## **Δ.6. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Το είδος της μεταμόσχευσης του μυελού των οστών εξαρτάται από το ποιος είναι ο δότης του μυελού ως εξής:

**Συγγενής αλλογενής μεταμόσχευση:** Το άτομο που δίνει τον μυελό των οστών ή τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα είναι μέλος της οικογένειας του ασθενή, που ταιριάζει γενετικά μαζί του (συνήθως αδελφός ή αδελφή του ασθενή).<sup>9</sup>

**Μη συγγενής αλλογενής μεταμόσχευση:** Το άτομο που δίνει τον μυελό των οστών δεν σχετίζεται συγγενικά με τον ασθενή. Οι πιθανότητες να βρεθεί μη συγγενής δότης από τον γενικό πληθυσμό εξαρτάται από την μοναδικότητα του ιστικού τύπου. Το γενετικό και εθνικό υπόστρωμα μπορεί επίσης να επηρεάσει την πιθανότητα να βρεθεί συμβατός δότης.<sup>9</sup>

**Συγγενετική μεταμόσχευση:** Το άτομο που δίνει τον μυελό των οστών ή τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα είναι μονοωογενής δίδυμος αδελφός ή αδελφή του ασθενή.<sup>9</sup>

**Αυτόλογη μεταμόσχευση:** Ο ασθενής δίνει τον δικό του μυελό των οστών ή τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα πριν τη θεραπεία για να του δοθούν πίσω αργότερα.<sup>9</sup>

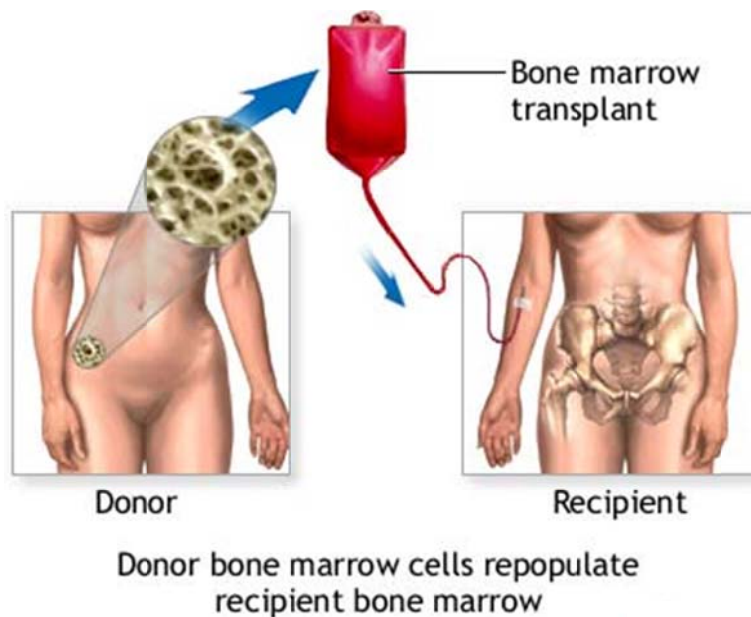
**Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων περιφερικού αίματος:** Ο ασθενής ή ο δότης δίνει αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία συλλέγονται από το αίμα του αντί για τον μυελό των οστών. Η μόνη διαφορά με αυτό το είδος της μεταμόσχευσης του μυελού των οστών είναι η προέλευση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και ο τρόπος συλλογής τους.<sup>9</sup>

**Μεταμόσχευση ομφαλοπλακουντιακού αίματος:** Το μόσχευμα προέρχεται από το ομφάλιο αίμα, ένα βιολογικό υλικό που μετά τον τοκετό συνηθίζεται να απορρίπτεται. Το αίμα ομφάλιου λώρου είναι μια ευρέως αποδεκτή πηγή προγονικών κυττάρων για μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων



(HSCT) και πάνω από 10.000 διαδικασίες έχουν πραγματοποιηθεί σε όλο τον κόσμο. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την έκβαση της μεταμόσχευσης είναι ο βαθμός της HLA συμβατότητας και η δόση εμπύρηνων κυττάρων. Η μεταμόσχευση ομφαλικού αίματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με συμβατότητα 4 στα 6 HLA αλληλόμορφα (λαμβάνοντας υπόψη τα HLA-A, B, και -DRB1 γονίδια), αλλά ιδανικά η συμβατότητα πρέπει να είναι 5 στα 6 αλληλόμορφα HLA και θα πρέπει να περιέχονται τουλάχιστον  $2.5 \times 10^7$  εμπύρηννα κύτταρα (NC) / kg (σωματικό βάρος λήπτη). Όταν πληρούνται αυτά τα κριτήρια, η θεραπεία μπορεί να είναι επιτυχής σε περισσότερο από το 50% των ασθενών.<sup>9,50</sup>

## Δ.7. Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ



ΕΙΚΟΝΑ 11. Κύτταρα του μυελού του δότη συμπληρώνουν εκ νέου τα κύτταρα του λήπτη. (<http://diyhealth.com/bone-marrow-transplant-has-serious-side-effects.html>)

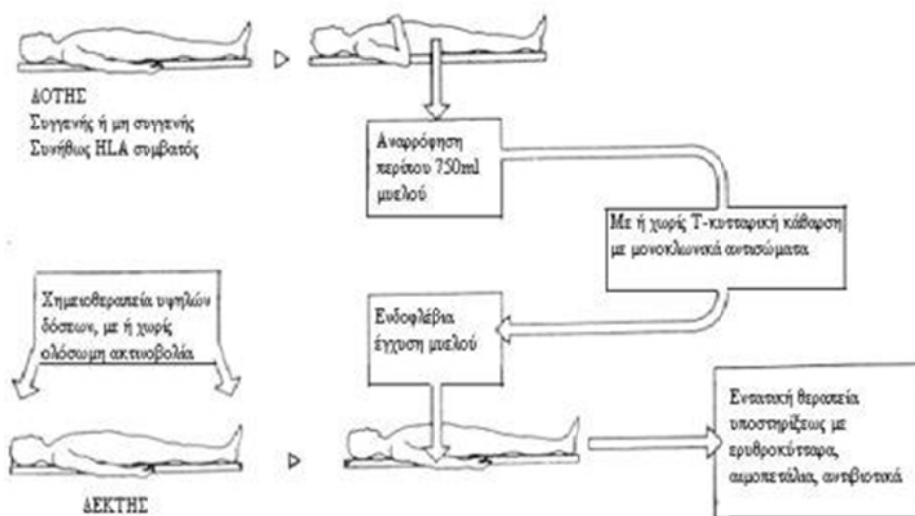
## Δ.7.1. Αλλογενής μεταμόσχευση

### Δ.7.1.1. Ενδείξεις

Η αλλογενής ΜΜΟ έχει χρησιμοποιηθεί κλινικώς για ένα ευρύ φάσμα επίκτητων παθήσεων νεοπλασματικού ή μη χαρακτήρα , καθώς και για συγγενείς αιματολογικές και μεταβολικές παθήσεις. Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών που έχουν υποστεί αλλογενή μεταμόσχευση είχαν οξεία λευχαιμία, χρόνια μυελογενής λευχαιμία, απλαστική αναιμία ή μεσογειακή αναιμία.<sup>2,3</sup>

Νοσήματα στα οποία έχει κριθεί επιτυχής η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών είναι τα εξής:

- Οξεία λευχαιμία
- Χρόνια μυελογενής λευχαιμία
- Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο
- Μυελοσκλήρυνση
- Απλαστική αναιμία
- Πολλαπλούν μύελωμα
- Λεμφώματα
- Αναιμία Fanconi
- Μεσογειακή αναιμία
- Δρεπανοκυτταρική αναιμία
- Παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία
- Οστεοπέτρωση
- Συγγενείς μεταβολικές διαταραχές
- Θρομβοασθένειες
- Σύνδρομο Wiskott-Aldrich
- Συγγενείς όγκοι
- Διαταραχές κοκκιοκυττάρων<sup>2,3</sup>



ΕΙΚΟΝΑ 12.Αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών.(Διδακτορική Διατριβή Πέτρου Α. Γαλάνη, 2006)

#### Δ.7.1.2. Προετοιμασία του ασθενούς

Τα πρωτόκολλα που προηγούνται της αλλογενούς ΜΜΟ περιλαμβάνουν το συνδυασμό υψηλής δόσης χημειοθεραπείας με ολική σωματική ακτινοβολία. Σκοπός είναι η καταστολή του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή (λήπτη), ώστε να δημιουργηθούν κατάλληλες συνθήκες για την ανοχή του μοσχεύματος και την εξαφάνιση των κακοηθών κυτταρικών πληθυσμών. Κατά την αλλογενή μεταμόσχευση επιτρέπεται η χορήγηση υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας και ακτινοβολία, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η μυελοτοξικότητα, εφόσον το μόσχευμα εξασφαλίζει την ανοσοαιματολογική αποκατάσταση του δέκτη.<sup>2,3</sup>

#### Δ.7.1.3. Λήψη και χορήγηση του μυελού

Ο μυελός λαμβάνεται από τον δότη υπό γενική αναισθησία σε συνθήκες χειρουργείου. Πιο συγκεκριμένα γίνονται πολλαπλές παρακεντήσεις και αναρροφήσεις στις πρόσθιες και οπίσθιες λαγόνιες ακρολοφίες ή και το στέρνο. Ο αναρροφώμενος μυελός μεταφέρεται σε δοχεία με θρεπτικό υλικό και ηπαρίνη. Κατόπιν διέρχεται από κατάλληλους ηθμούς, ώστε να απομακρυνθούν τα μικρά τεμάχια οστικών δοκίδων και οι τυχόν θρόμβοι και τελικά μεταφέρεται σε ασκούς αίματος. Όταν ο δότης είναι ενήλικας αναρροφάται περίπου 1 λίτρο μυελού, ποσότητα η οποία είναι ικανή να διασφαλίσει στον λήπτη  $3 \cdot 10^8$  περίπου

μονοπυρηνικά κύτταρα ανά κιλό βάρους. Στη συνέχεια ο μυελός χορηγείται ενδοφλεβίως στον λήπτη, αφού, προηγουμένως του χορηγηθεί προπαρασκευαστικό διάλυμα με σκοπό την καταστολή του ανοσολογικού συστήματος για την καλή αποδοχή του μοσχεύματος (ανοχή) και την μείωση των κακοηθών κυτταρικών πληθυσμών. Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του μυελού τα μητρικά αιμοποιητικά κύτταρα που περιέχονται σε αυτόν, μεταναστεύουν στις οστικές μυελικές κυψέλες όπου και αναπτύσσονται (εικ.12).<sup>2,3</sup>

#### **Α.7.1.4. Επιπλοκές**

Οι επιπλοκές της αλλογενούς μεταμόσχευσης μυελού των οστών είναι:

- Νόσος του μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή
- Διάμεσες πνευμονοπάθειες
- Φλεβοαποφρακτική νόσος ήπατος
- Οφθαλμολογικές επιπλοκές (καταρράκτης)
- Ορμονικές διαταραχές (μόνιμη στειρότητα, αναστολή ανάπτυξης στα παιδιά)
- Επιπλοκές λόγω της ακτινοβολίας και της χημειοθεραπείας (εμετός, ναυτία, βλεννογονίτιδα, οισοφαγίτιδα, νεφρική ανεπάρκεια, καρδιακές διαταραχές)<sup>2,3</sup>

#### **Α.7.2. Αυτόλογη μεταμόσχευση**

Πειράματα σε ζώα, τη δεκαετία του '60, έδειξαν ότι σε όγκους που είναι ευαίσθητοι στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα ή στην ακτινοβολία, το θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι ανάλογο με τη θεραπευτική δόση. Ανάλογη ήταν και η εμπειρία από τη χρήση της χημειοθεραπείας και της ακτινοβολίας στον άνθρωπο. Η χρήση, όμως, μεγάλων δόσεων πολλών χημειοθεραπευτικών ουσιών ( και της ολόσωμης ακτινοβολίας) περιορίζεται από την μη αναστρέψιμη μυελική απλασία που προκαλούν. Η αυτόλογη ΜΜΟ παρακάμπτει το εμπόδιο αυτό και οι δόσεις φαρμάκων και ακτινοβολίας μπορούν να αυξηθούν πέραν του ορίου που θέτει η μη αναστρέψιμη μυελική απλασία. Η επιτυχία της χορήγησης, σε ασθενείς με κακοήθη νοσήματα, μεγάλων δόσεων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ή ολόσωμης ακτινοβολίας με υποστήριξη από αλλογενή ΜΜΟ οδήγησε στη χρήση των ίδιων θεραπευτικών μεθόδων, αλλά με υποστήριξη από αυτόλογη ΜΜΟ. Οι πρώτες επιτυχείς αυτόλογες ΜΜΟ έγιναν στο Σιάτλ (ΗΠΑ). Επειδή η αυτόλογη ΜΜΟ στερούνταν ουσιωδών επιπλοκών, που

συνοδεύουν συχνά την αλλογενή, αποδείχθηκε πολύ πιο εύκολη και ασφαλής από την αλλογενή και ως εκ τούτου εφαρμόστηκε σε ευρύτερο φάσμα κακοηθών νόσων του αίματος και άλλων συμπαγών όγκων και σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας από ότι η αλλογενής.<sup>2,3</sup>

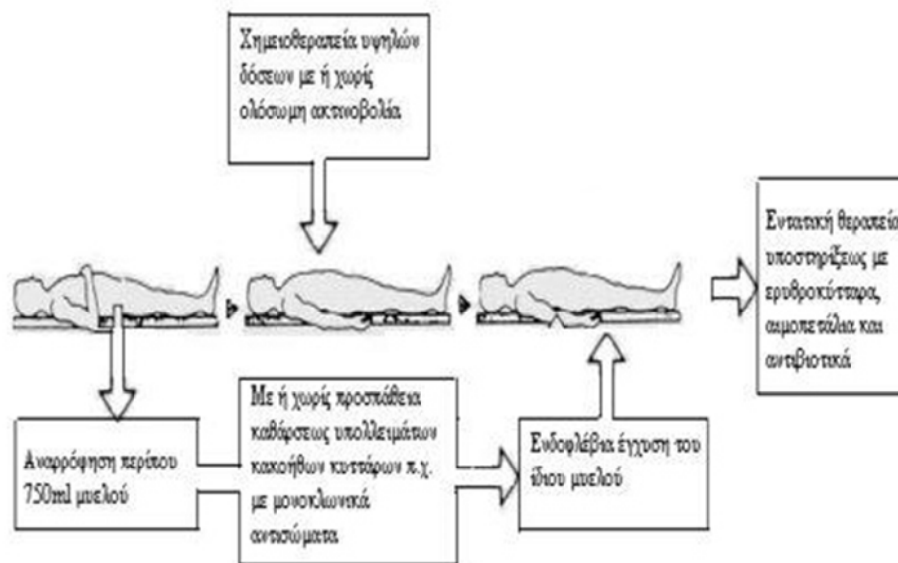
#### **Α.7.2.1. Ενδείξεις**

Η σχετικά μεγάλη τοξικότητα της αλλογενούς ΜΜΟ, το μικρό ποσοστό ασθενών που έχουν συμβατό δότη και η ύπαρξη χημειοευαίσθητων κακοηθειών οδήγησαν στη ραγδαία ανάπτυξη της αυτόλογης ΜΜΟ. Στην Ευρώπη, το 1991, η αυτόλογη ΜΜΟ αποτελούσε το 50% του συνόλου των μεταμοσχεύσεων. Οι οξείες λευχαιμίες (οξεία μυελοειδής και οξεία λεμφοβλαστική), η χρόνια μυελογενής λευχαιμία και τα λεμφώματα (Hodgkin και μη Hodgkin) αποτελούν τις συχνότερες παθήσεις για τις οποίες εφαρμόζεται η αυτόλογη ΜΜΟ. Το πολλαπλούν μυέλωμα και οι συμπαγείς όγκοι αποτελούν τις υπόλοιπες ενδείξεις.<sup>2,3</sup>

Η λογική της εφαρμογής της αυτόλογης μεταμόσχευσης (ΑΜΜΟ) στα λεμφώματα, όπως εξάλλου και στα άλλα κακοήθη νοσήματα, βασίζεται κυρίως: α) στη γνωστή ευαισθησία των λεμφωματικών κυττάρων στις υψηλές δόσεις κυτταροστατικών και την ακτινοβολία ακόμα και αν το νόσημα έχει υποτροπιάσει, β) στη μείωση της μυελοτοξικότητας της θεραπείας και της περιόδου της απλαστικής φάσης λόγω αυτόλογης αποκατάστασης της αιμοποίησης, γ) στην υπερνίκηση των επιπλοκών της αλλογενούς ΜΜΟ, όπως η αντίδραση του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (GVHD) και άλλων ανοσολογικών επιπλοκών και δ) στην αντιμετώπιση αρρώστων μεγαλύτερης ηλικίας ή και χωρίς απόλυτα συμβατό δότη. Όπως και στις περιπτώσεις οξείας λευχαιμίας, η ομοιογονιδιακή μεταμόσχευση μυελού (από δότη μονοωικό δίδυμο αδερφό), έγινε το πρότυπο για την εφαρμογή της ΑΜΜΟ στα λεμφώματα. Εντούτοις η αλλογενής ΜΜΟ πλεονεκτεί επειδή δεν επαναχορηγούνται με το μόσχευμα κακοήθη κύτταρα και μπορεί να συνοδεύεται από την εμφάνιση μιας αντίδρασης του μοσχεύματος κατά των λεμφωματικών κυττάρων (αντίστοιχη με την αντίδραση GVL στις οξείες λευχαιμίες), γεγονότα που συνοδεύονται ίσως από μικρότερη πιθανότητα υποτροπής του λεμφώματος μετά τη μεταμόσχευση. Η αλλογενής ΜΜΟ όμως γίνεται κυρίως από απόλυτα συμβατούς δότες στο σύστημα HLA και σε αρρώστους νεαρής ηλικίας, γεγονός που περιορίζει την τέλεσή της μόνο

σε ένα μικρό αριθμό αρρώστων. Συνοδεύεται επίσης από σοβαρότερες επιπλοκές όπως κυρίως η αντίδραση του μοσχεύματος κατά του ξενιστή υπό την οξεία ή τη χρόνια μορφή της. Αντίθετα το αυτόλογο μόσχευμα μπορεί να περιέχει παραμένοντα λεμφωματικά κύτταρα, που μαζί με την απουσία της αντίδρασης GVL, πιθανόν να ευθύνονται για την αύξηση των υποτροπών μετά την AMMO, ακόμα και αν δεν υπάρχει πρωτοπαθής εντόπιση του λεμφώματος στον μυελό. Η AMMO είναι επίσης προσιτή σε όλους τους αρρώστους ακόμα και μεγαλύτερης ηλικίας, ενώ δε συνοδεύεται από τις βαριές επιπλοκές της αλλογενούς μεταμόσχευσης.<sup>44,45,46</sup>

Ωστόσο, η εφαρμογή της MMO σαν αρχικής θεραπείας των λεμφωμάτων έχει γίνει σε πολύ λίγες περιπτώσεις αρρώστων, επειδή τα μέχρι τώρα αποτελέσματα της συμβατικής θεραπείας είναι αρκετά ικανοποιητικά. Δε βρέθηκε υπεροχή της MMO σε σχέση με την κλασική θεραπεία σαν πρώτη γραμμής θεραπεία, και συνεπώς η προσέγγιση αυτή δεν συνιστάται στη διάγνωση.<sup>44,45,46</sup>



**ΕΙΚΟΝΑ 13.** Αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών. (Διδακτορική Διατριβή Πέτρου Α. Γαλάνη, 2006)

#### Δ.7.2.2. Προετοιμασία του ασθενούς

Περιλαμβάνει κλινικό και εργαστηριακό έλεγχο της γενικής κατάστασης του ασθενούς, των εντοπίσεων της νόσου, της εικόνας του ΜΟ και της αντίδρασης του οργανισμού στη χημειοθεραπεία. Για τις εντοπίσεις της νόσου, εκτός από την κλινική εξέταση, διενεργούνται αξονικές ή μαγνητικές τομογραφίες, σπινθηρογραφήματα, υπερηχογραφήματα, ακτινογραφίες, βιοψίες κ.α. Απαραίτητη είναι η διενέργεια οστεομυελικής βιοψίας και μυελογράμματος πριν από την αυτόλογη ΜΜΟ για να διαπιστωθεί αν υπάρχει ή όχι διήθηση της νόσου στο ΜΟ, αλλά και για να εκτιμηθεί η περιεκτικότητα σε κύτταρα του μυελού.<sup>2,3</sup>

#### Δ.7.2.3. Λήψη και διατήρηση του μυελού

Η λήψη του μυελού είναι παρόμοια με αυτήν της αλλογενούς ΜΜΟ. Ο μυελός συλλέγεται σε ειδικούς σάκους που περιέχουν αντιπηκτικό, διαλυμένο σε θρεπτικό υλικό. Ο μυελός που συλλέχθηκε, περνάει από διαδοχικά φίλτρα και φυλάσσεται σε ειδικούς ασκούς. Η φύλαξή του γίνεται στους 4<sup>0</sup> C ή συνηθέστερα σε κρυοκατάψυξη στους-80°C(εικ.13) .<sup>2,3</sup>

#### Δ.7.2.4. In vitro «κάθαρση» του μυελού

Η αυτόλογη ΜΜΟ γίνεται και σε ασθενείς που ενδεχομένως να έχουν υπολειμματική νόσο (οξείες λευχαιμίες) ή διήθηση (λεμφώματα κ.α.) στον ΜΟ. Στις περιπτώσεις αυτές πολλοί επιχειρούν «καθαρισμό» (purging) του μυελού από τα παθολογικά κύτταρα. Ο «καθαρισμός» αυτός πραγματοποιείται in vitro, αφού γίνει απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και του πλάσματος και πριν προστεθεί η κρυοπροστατευτική ουσία. Οι κυριότερες μέθοδοι είναι η φαρμακευτική και η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Πριν τη μεταμόσχευση, δίνονται διάφορα σχήματα θεραπείας προετοιμασίας με συνδυασμούς υψηλών δόσεων κυτταροστατικών ή και ολόσωμη ακτινοβολία (TBI). Οι δύο μέχρι τώρα συχνότερα εφαρμοζόμενες προσεγγίσεις είναι η χορήγηση σχημάτων που περιέχουν υψηλές δόσεις κυκλοφωσφαμίδης (CP) ή ετοποσίδης (VP16) και TBI για την αλλογενή ΜΜΟ ή η χορήγηση συνδυασμών κυτταροστατικών όπως π.χ. τά σχήματα BACT (BCNU, Ara-C, CP, 6TG), BEAM (BCNU, VP16, Ara-C, melphalan), LACE (lomustine, Ara-C, CP) και οι παραλλαγές τους για την ΑΜΜΟ.<sup>2,3, 44,45,46</sup>

Η επιλογή των φαρμάκων παραμένει ακόμα εμπειρική, αν και ορισμένα σχήματα έχουν γίνει κλασσικά σαν θεραπεία προετοιμασίας (π.χ. BEAM, LACE για την ΑΜΜΟ ή CP και TBI για την αλλογενή ΜΜΟ).<sup>44,45,46</sup>

Ο μεγαλύτερος περιορισμός στη χρήση της αυτόλογης ΜΜΟ σε αρρώστους με λευχαιμίες, προέρχεται από τον κίνδυνο ύπαρξης απόκρυφων νεοπλασματικών κυττάρων στο ΜΟ, ακόμα και αν αυτά δεν παρατηρούνται στα παρασκευάσματα με το μικροσκόπιο κατά τη φάση της ύφεσης. Το ίδιο ισχύει για τα λεμφώματα και για άλλα νεοπλασματικά νοσήματα όπως το νευροβλάστωμα, το οποίο διηθεί το ΜΟ.<sup>2,3</sup>

Ένας τρόπος αντιμετώπισης αυτού του προβλήματος είναι η in vitro «κάθαρση» του μυελικού εναιωρήματος, πριν τη διατήρηση σε βαθιά κατάψυξη, και η έγχυσή του στον κατάλληλο χρόνο στον λήπτη. Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στο να εξαλειφθούν τα υπολειμματικά κακοήθη κύτταρα από το μόσχευμα. Αυτός ο τρόπος χειρισμού του αυτόλογου μυελού θα μπορούσε να απαλείψει τελείως όλα τα απόκρυφα νεοπλασματικά κύτταρα, επιτρέποντας έτσι τη γρήγορη αιματολογική επαναπληθυσμοποίηση, μετά από έντονη κυτταροτοξική θεραπεία.<sup>2,3</sup>



#### **Δ.7.2.5. Επιπλοκές**

- Τοξικότητα
- Επανεισαγωγή κακοηθών κυττάρων.<sup>2, 3</sup>

### **Δ.8. Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΔΟΤΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Η πρώτη φροντίδα προκειμένου να γίνει μεταμόσχευση μυελού είναι να αναζητηθεί ο κατάλληλος δότης. Κατά σειρά προτίμησης επιλέγεται:

1. Ένας μονοωικός δίδυμος αδερφός ή αδερφή.
2. Ένας αδερφός ή αδερφή απόλυτα HLA συμβατός.
3. Ένα HLA συμβατό άτομο μη μέλος της οικογένειας, από δεξαμενή εθελοντών δοτών μυελού.
4. Γονείς φαινοτυπικά HLA συμβατούς.
5. Δότες μη απόλυτα συμβατούς ως προς το σύστημα HLA.<sup>3</sup>

### **Δ.9. ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΛΗΨΗΣ ΤΟΥ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ**

- Προβλήματα αναισθησίας
- Διάτρηση ζωτικών οργάνων
- Αιμορραγία
- Αναιμία
- Λοίμωξη
- Υποογκαιμία
- Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση
- Λιπώδης εμβολή
- Εμβολή αέρος
- Παροδικές νευροπάθειες
- Ανεξήγητος πυρετός
- Σπάσιμο βελόνης στις θέσεις αναρρόφησης

- Άλγος στις θέσεις αναρρόφησης <sup>3</sup>

## **Δ.10. ΟΙ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ**

Η όλη διαδικασία της μεταμόσχευσης προδιαθέτει στην εμφάνιση βαριών και συχνά θανατηφόρων επιπλοκών. Πρόκειται, συνήθως, για δευτερογενή αποτελέσματα της έντονης θεραπείας προετοιμασίας, για την αντίδραση του μοσχεύματος κατά του ξενιστή υπό την οξεία ή χρόνια μορφή, την απόρριψη του μοσχεύματος, τις άμεσες πνευμονίτιδες και για πολλές λοιμώδεις επιπλοκές από βακτηρίδια, μύκητες, ιούς ή/και ευκαιριακές λοιμώξεις που θέτουν πάντα πολυάριθμα και δύσκολα διαγνωστικά και θεραπευτικά προβλήματα. <sup>3</sup>

Η απόρριψη του μοσχεύματος είναι μία σπάνια διαταραχή στις μεταμοσχεύσεις μυελού, αντίθετα με ό,τι παρατηρείται στις μεταμοσχεύσεις των άλλων οργάνων. Παραμένει, όμως, ένα μεγάλο πρόβλημα στις μεταμοσχεύσεις από δότες μη απόλυτα συμβατούς στο σύστημα HLA. Επιπλέον οι προσπάθειες αφαίρεσης των T-λεμφοκυττάρων από το μόσχευμα, με σκοπό τον περιορισμό της οξείας αντίδρασης του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (Graft versus host Disease-GVHD), έχει αυξήσει τη συχνότητα των απορρίψεων. <sup>3,54</sup>

## **Δ.11. Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ- GRAFT VERSUS HOST DISEASE**

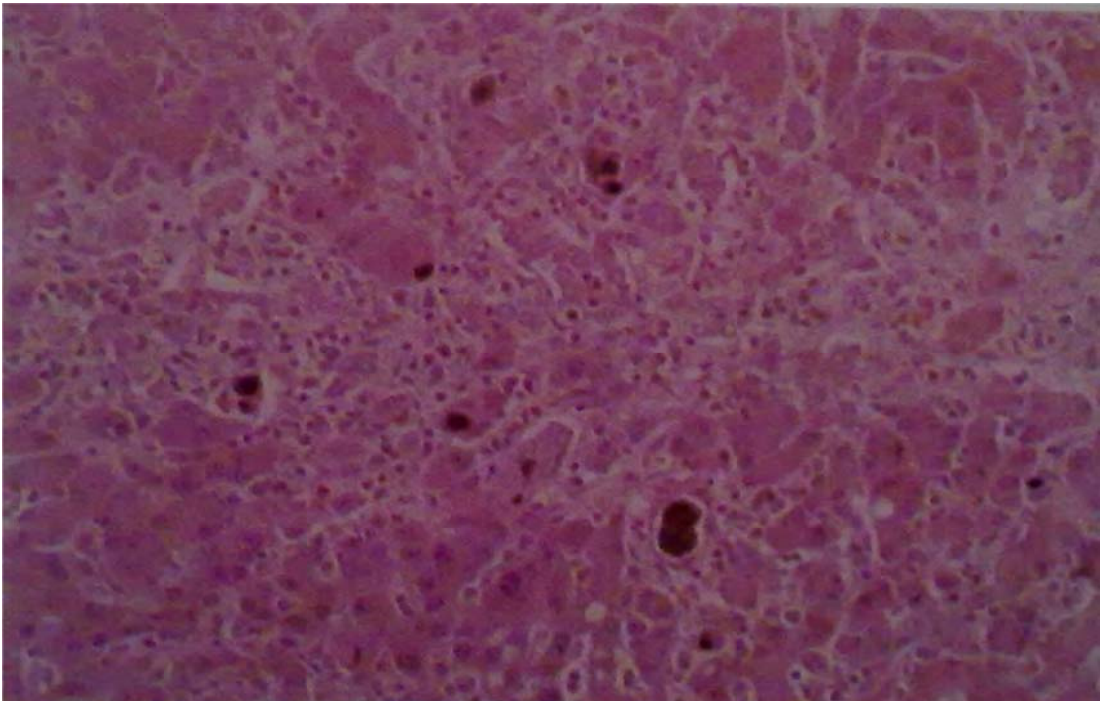
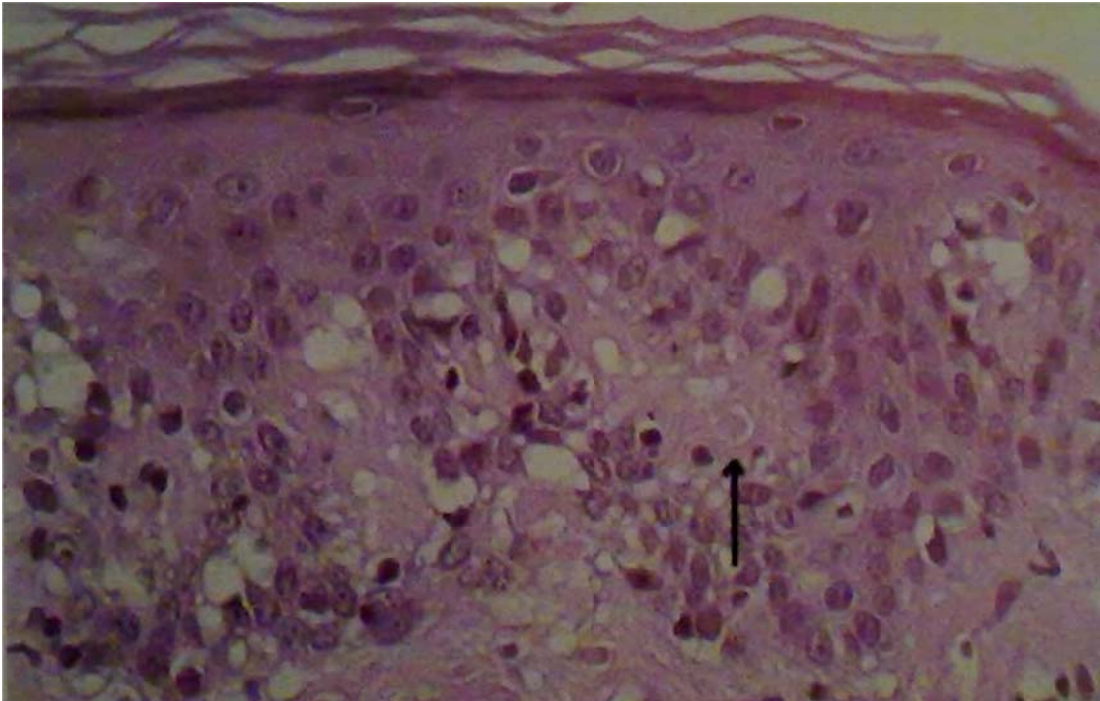
Ακόμα και στις περιπτώσεις πλήρους γονοτυπικής ομοιότητας ως προς το σύστημα HLA, η αντίδραση GVHD αποτελεί συχνή και βαριά επιπλοκή μετά τη μεταμόσχευση μυελού, αφού παρατηρείται περίπου στο 50-70% των περιπτώσεων και είναι αιτία θανάτου στο 20-25%. Εξελίσσεται σε δύο φάσεις, σε οξεία και χρόνια, των οποίων ο μηχανισμός είναι πιθανότατα διαφορετικός. Οφείλεται στην ενεργοποίηση των ώριμων T-λεμφοκυττάρων του δότη από τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας του λήπτη. Η βαρύτητα και ο χρόνος εμφάνισής της εξαρτώνται από τον αριθμό των λεμφοκυττάρων που περιέχει το μόσχευμα και από το βαθμό ιστοσυμβατότητας του δότη και λήπτη (εικ.14). <sup>3,24</sup>

Η οξεία αντίδραση GVHD μπορεί να εμφανιστεί σε άλλο χρονικό διάστημα μετά τη μεταμόσχευση μυελού. Πιο συχνά κάνει την εμφάνισή της κατά τη διάρκεια τα δεύτερης ή τρίτης εβδομάδας, σπανιότερα παρουσιάζεται την πρώτη εβδομάδα και ακόμα πιο σπάνια μεταξύ της 50ης και 100ης ημέρας μετά τη μεταμόσχευση. Τα πρώτα συμπτώματά της εμφανίζονται συνήθως ταυτόχρονα με τα πρώτα σημεία της αιματολογικής αποκατάστασης.<sup>3,24</sup>

Τα όργανα στόχοι της οξείας GVHD είναι το δέρμα, το ήπαρ και ο γαστρεντερικός σωλήνας. Χαρακτηριστικά, τα αρχικά κλινικά συμπτώματα είναι δερματικές βλάβες.<sup>3,24</sup> Σε πιο βαριές μορφές, μπορεί να εμφανιστεί ένα έντονα επώδυνο γενικευμένο ερύθημα, που μπορεί να εξελιχθεί σε απολέπιση της επιδερμίδας.<sup>3,24</sup>

Η χρόνια αντίδραση GVHD μπορεί να εμφανιστεί οποτεδήποτε εντός του πρώτου έτους μετά τη MMO. Γενικά, τα συμπτώματα της χρόνιας αντίδρασης GVHD δεν εμφανίζονται πριν την 100η μέρα, και σε εξαιρετικές περιπτώσεις γύρω από την 70η.<sup>3,24</sup>

Η ολική συχνότητα της χρόνιας αντίδρασης GVHD περίπου 30-50% σε ασθενείς που ζουν άνω των 6 μηνών μετά MMO από HLA συμβατά αδέρφια. Στους περισσότερους ασθενείς που προσβάλλονται, τα συμπτώματα της χρόνιας αντίδρασης GVHD εμφανίζονται είτε μετά από ένα διάστημα χωρίς συμπτώματα ή αμέσως μετά την οξεία αντίδραση GVHD. Στο 20-30% των ασθενών, εντούτοις, η χρόνια αντίδραση GVHD είναι η πρώτη κλινική εκδήλωση της μη ιστοσυμβατότητας. Η οξεία αντίδραση GVHD είναι ο κυριότερος καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη χρόνιας αντίδρασης GVHD. Ανάλογα με τον βαθμό της προσβολής οργάνων, δύο κλινικές πορείες της χρόνιας αντίδρασης GVHD μπορεί να διακριθούν: η περιορισμένη χρόνια αντίδραση GVHD συνίσταται σε γενικευμένες κλινικές εκδηλώσεις ή εντοπισμένες δερματικές εκδηλώσεις και η πιο έντονη αντίδραση με πιο βαριά ηπατική προσβολή, προσβολή των σιελογόνων αδένων ή άλλων οργανικών συστημάτων (εικ.15).<sup>3,24</sup>



### **Δ.11.1. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ GRAFT VERSUS HOST DISEASE**

**Δέρμα και εξαρτήματα:** Ερύθημα, απολέπιση, δυσχρωσία, σκληροδερμία, αλωπεκία, δυστροφία νυχιών, φωτοευαισθησία, φαινόμενο Raynaud, συρρικνώσεις (εικ.17).<sup>3</sup>

**Ήπαρ:** Ήκτερος, ηπατομεγαλία

**Βλεννογόνοι:** Στοματίτιδα, ξηροστομία, στοματικός λειχήνας, κολπίτιδα (εικ.18).

**Μάτια:** Ξηροφθαλμία, κερατίτιδα, ελκώσεις στον κερατοειδή, φωτοφοβία (εικ.16).

**Οισοφάγος:** Οισοφαγίτιδα, στένωση.

**Γαστρεντερικός σωλήνας:** Εντερίτιδα, δυσαπορρόφηση.

**Ορογόνοι:** Πολυρογονίτιδα.

**Μυοσκελετικό σύστημα:** Πολυμυοσίτιδα, υμενίτιδα, άλγη αρθρώσεων, τενοντίτιδα, ηωσινοφιλική περιτονίτιδα.

**Πνεύμονες:** Αλλοιώσεις αποφρακτικού ή περιοριστικού τύπου, διάμεση πνευμονίτιδα.

**Καρδιά:** Μυοκαρδιοπάθεια.

**Άλλα:** Ευαισθησία στις λοιμώξεις, απώλεια βάρους.<sup>3</sup>



για  
ιστ-





Ύγια νόσου

### Δ.11.2. ΤΑ ΜΕΤΡΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ GVHD

Τα μέτρα για την αντιμετώπιση της αντίδρασης GVH είναι προφυλακτικά και θεραπευτικά. Η πρόληψη γίνεται με την εκλογή του κατάλληλου δότη, τη νοσηλεία σε αποστειρωμένο περιβάλλον, την πρόληψη των λοιμώξεων και τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Η εμφάνιση και η βαρύτητα της αντίδρασης μειώνονται αλλά φαίνεται ότι αυξάνεται η συχνότητα των απορρίψεων και των υποτροπών ιδιαίτερα της λευχαιμίας μετά τη μεταμόσχευση.<sup>3</sup>

Αργότερα, η καλή γενική κατάσταση του μεταμοσχευμένου μπορεί να διαταραχθεί από όψιμες επιπλοκές, οι οποίες είναι:

**Γενικά:** Δεύτερα νεοπλάσματα, λοιμώξεις, αυτοάνοσα φαινόμενα.

**Δέρμα:** Διαταραχή χρώσης, σκλήρυνση, πάχυνση, λειχηνοειδείς βλάβες σε βλεννογόνους, ξηρό σύνδρομο- ξηροφθαλμία, ξηροστομία, κακή τρίχωση και αύξηση νυχιών, πρόωρη καταστροφή δοντιών.

**Πνευμονικές:** Διάμεση πνευμονίτιδα, αποφρακτική βρογχιολίδα, υποτροπιάζουσα βρογχίτιδα και βρογχοπνευμονία.

**Ηπατική λειτουργία:** Χρόνια ενεργός ηπατίτιδα, χολική κίρρωση.

**Πεπτικός σωλήνας:** Δυσασπορρόφηση με απώλεια βάρους και διάρροια.

**Ενδοκρινείς αδένες:** Ανεπάρκεια ανάπτυξης, πρόωρη εμμηνόπαυση, ανεπάρκεια όρχεων, στέρωση, υπολειτουργία θυρεοειδούς.

**Νεφρικές:** Όψιμη αναιμία, υπέρταση και κατακράτηση υγρών, μειωμένη σπειραματική διήθηση, αιμορραγική κυστίτιδα.

**Νευρολογικές και ψυχολογικές:** Πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια, διαταραγμένη ψυχολογική ανάπτυξη στα παιδιά, δυσκολίες προσαρμογής, πολυνευροπάθεια, βαριά μυασθένεια, σεξουαλική δυσλειτουργία.

**Οφθαλμικές:** Καταρράκτης, ξηρό σύνδρομο.

**Οστικά προβλήματα:** Οστεοπόρωση, άσηπτη νέκρωση.

**Μυοσκελετικές:** Μυοσίτιδα, αρθρίτιδα.<sup>3</sup>

Η πρόωμη διάγνωση των επιπλοκών και η κατάλληλη αντιμετώπισή τους επιτρέπουν συχνά τη γρήγορη υποχώρησή τους, γεγονός που εξηγεί τη βαριά ευθύνη που επιφορτίζονται ιατροί και νοσηλευτικό προσωπικό για τη στενή παρακολούθηση των ασθενών. Τα κύρια συμπτώματα θα πρέπει να εξηγούνται στον ασθενή και το περιβάλλον του, για την έγκαιρη ενημέρωση των γιατρών της μονάδας μεταμόσχευσης και την ταχεία διάγνωση και αντιμετώπισή τους. Αυτή η αρμονική συμβίωση ασθενή και θεραπόντων φαίνεται συχνά αρκετά επίπονη και δύσκολη, αλλά είναι ο μοναδικός τρόπος επιτυχίας.<sup>3</sup>

Κάποιες φορές χορηγούνται στους παραλήπτες τις μέρες πριν από τη μεταμόσχευση αγωγές με κυκλοσπορίνη Α (CsA), η δόση της οποίας μειώνεται σταδιακά μετά τη μεταμόσχευση.<sup>53</sup>



### **Δ.11.3. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ**

Σημαντικό ρόλο τόσο για την έκβαση της μεταμόσχευσης όσο και για την εμφάνιση πολλών επιπλοκών, παίζει ή σταθερή και παρατεταμένη ανοσολογική ανεπάρκεια που τη συνοδεύει. Αποκατάσταση της ανοσολογικής λειτουργίας ιδιαίτερα μετά την αλλογενή μεταμόσχευση μυελού είναι, μία πολύπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες που επιδρούν, τόσο πριν όσο και μετά τη μεταμόσχευση.<sup>3</sup>

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΠΡΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΤΙΚΟΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

### Α.1.ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΠΡΙΝ ΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ

Η προ-μεταμοσχευτική αξιολόγηση περιλαμβάνει μια ποικιλία από ιατρικές εξετάσεις που παρέχουν πλήρεις πληροφορίες σχετικά με τη γενική κατάσταση υγείας του δέκτη μυελού των οστών. Αυτές οι ιατρικές εξετάσεις βοηθούν τους ειδικούς της μεταμόσχευσης να εντοπίσουν τυχόν προβλήματα πριν τη μεταμόσχευση και αποφύγουν πιθανές επιπλοκές μετά τη από αυτή. Οι εξετάσεις αυτές διαφέρουν κατά ασθενή-δέκτη του μοσχεύματος, αλλά είναι κυρίως οι παρακάτω.<sup>32,33,34,35</sup>

#### Αιματολογικές εξετάσεις

Ο υπεύθυνος υγείας ή ο τεχνολόγος παίρνει ένα δείγμα αίματος από το χέρι ή μέσω κεντρικού φλεβικού καθετήρα (αν αυτός υπάρχει) και το δείγμα αποστέλλεται στο εργαστήριο, όπου γίνονται οι ακόλουθες εξετάσεις:

#### **Τυποποίηση ιστού (απαιτείται για αλλογενείς ασθενείς μόνο)**

Αυτή η εξέταση γίνεται κατά τη διάρκεια ή πριν από την πρώτη συνάντηση διαβούλευσης με τον γιατρό. Η ιστική τυποποίηση είναι μια σειρά από εξετάσεις αίματος, που αξιολογεί τη συμβατότητα ή την εγγύτητα των ιστών μεταξύ του δωρητή οργάνου και του λήπτη. Από τα δείγματα αίματος, το εργαστήριο ιστικής τυποποίησης μπορεί να εντοπίσει και να συγκρίνει πληροφορίες σχετικά με τα αντιγόνα του δέκτη (οι "δείκτες" σε κύτταρα που διεγείρουν την παραγωγή αντισωμάτων), έτσι ώστε να βρεθεί συμβατός δότης μυελού των οστών. Όλοι οι δότες εξετάζονται προσεκτικά για την αποφυγή τυχόν μεταδοτικών ασθενειών ή για τον εντοπισμό άλλων ιατρικών προβλημάτων, που μπορεί να τους αποτρέψει από την δωρεά μυελού των οστών.<sup>32,33,34,35</sup>

### **Άλλες αιματολογικές εξετάσεις**

Στο εργαστήριο, πραγματοποιείται μια σειρά από εξετάσεις για την ανίχνευση ορισμένων ουσιών στο αίμα και να αξιολογήσει τη γενική υγεία σας. Αυτές οι εξετάσεις αίματος περιλαμβάνουν:

### **Εξετάσεις για λοιμώδη νοσήματα όπως:**

- Ηπατίτιδα
- HIV (ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας)
- RPR (σύφιλη)
- Τοξοπλάσμωση
- Έρπητα Ζωστήρα
- CMV (κυτταρομεγαλοϊός)
- EBV (ιός Epstein-Barr)
- HSV (ιός απλού έρπητα)
- Ιός του Δυτικού Νείλου
- Νόσος Τσάγκα (Chagas) <sup>32,33,34,35</sup>

### **Εξετάσεις αίματος για οργανική λειτουργία:**

- Φερριτίνη
- Τεστ Εγκυμοσύνης
- Πλήρες Μεταβολικό Panel
- Αιμοσφαιρίνη
- ABO ομάδα αίματος
- Χρόνοι πήξης
- Αιμοπετάλια
- Ποσοτικός προσδιορισμός ανοσοσφαιρινών <sup>32,33,34,35</sup>

### **Άλλες πιθανές αιματολογικές εξετάσεις:**

- Έλεγχος πολλαπλού μυελώματος (σε ειδικά εργαστήρια) <sup>32,33,34,35</sup>

## **Άλλες εξετάσεις:**

### **Η ακτινογραφία θώρακος**

Η ακτινογραφία θώρακος παρέχει μια εικόνα της καρδιάς και των πνευμόνων. Αυτή η ακτινογραφία παρέχει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος της καρδιάς και των πνευμόνων, και θα μπορούσε να ανιχνεύσει την παρουσία πιθανής ασθένειας των πνευμόνων ή κάποια μόλυνση.<sup>32,33,34,35</sup>

### **Εξετάσεις πνευμονικής λειτουργίας**

Οι εξετάσεις πνευμονικής λειτουργίας μετρούν την ικανότητα και τη λειτουργία των πνευμόνων, καθώς και την ικανότητα του αίματος να μεταφέρει οξυγόνο. Κατά τη διάρκεια των εξετάσεων, ζητείται από τον ασθενή να αναπνέει σε μια συσκευή που ονομάζεται σπιρόμετρο.<sup>32,33,34,35</sup>

Μερικές οδηγίες πριν από την προγραμματισμένη εξέταση πνευμονικής λειτουργίας είναι:

- Αφθονία ύπνου το προηγούμενο βράδυ.
- Άνετη ένδυση κατά τη διάρκεια της εξέτασης
- Διατροφικός περιορισμός των υγρών και των γευμάτων πριν από την εξέταση.<sup>32,33,34,35</sup>

### **Αξονική τομογραφία (CT Scan)**

Μια αξονική τομογραφία, χρησιμοποιεί ακτίνες Χ και ηλεκτρονικό υπολογιστή για να παράγει μια λεπτομερή εικόνα του σώματος. Η αξονική τομογραφία αποκαλύπτει επίσης, την παρουσία και άλλων ανωμαλιών.<sup>32,33,34,35</sup>

Ανάλογα με την ασθένειά, ο γιατρός μπορεί να απαιτήσει επιπλέον αξονικές τομογραφίες, όπως:

### **Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET scan)**

Μια τέτοια τομογραφία αποτελεί μία μοναδική απεικόνιση, που βοηθά τους ιατρούς να εξετάσουν τη λειτουργία των οργάνων και των ιστών μέσα στο σώμα.

Η εξέταση περιλαμβάνει την έγχυση μιας πολύ μικρής δόσης ραδιενεργούς ουσίας, που ονομάζεται ραδιοιχνηθέτης, σε μια φλέβα. Ο ιχνηθέτης μεταφέρεται μέσω του σώματος και απορροφάται από τα όργανα και τους ιστούς που μελετώνται. Στη συνέχεια, ο ασθενής ξαπλώνει στην επίπεδη επιφάνεια, η οποία εισέρχεται στο κέντρο του αξονικού τομογράφου. Ο τομογράφος εντοπίζει και καταγράφει την

ενέργεια που εκπέμπεται από την ιχνηθέτη ουσία. Έτσι μπορεί να μετρήσει ζωτικής σημασίας λειτουργίες, όπως τον μεταβολισμό της γλυκόζης, ο οποίος βοηθά τους γιατρούς να εντοπίσουν την ανώμαλη λειτουργία των οργάνων και ιστών. Η διαφορά του από άλλους τομογράφους είναι ότι αποκαλύπτει τις μεταβολικές ανωμαλίες σε ένα όργανο ή ιστό σε κυτταρικό επίπεδο.<sup>32,33,34,35</sup>

### **Καρδιολογικές εξετάσεις**

Λόγω της χημειοθεραπείας ή της ακτινοθεραπείας που δέχεται ο ασθενής για την μεταμόσχευση, είναι πιθανό να προκληθούν τυχόν καρδιολογικά προβλήματα. Για αυτό το λόγο χρειάζεται να γίνουν κάποιες καρδιολογικές εξετάσεις πριν τη διαδικασία της μεταμόσχευσης. Αυτές οι εξετάσεις περιλαμβάνουν:

#### **Ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ)**

Ένα ΗΚΓ χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του καρδιακού ρυθμού. Πριν από την εξέταση, τοποθετούνται ηλεκτρόδια (μικρά, επίπεδα, κολλώδη επιθέματα) στο στήθος του ασθενή. Τα ηλεκτρόδια αυτά, συνδέονται με ένα ηλεκτροκαρδιογράφο, ο οποίος εμφανίζει σε μορφή διαγραμμάτων την ηλεκτρική δραστηριότητα της καρδιάς (καρδιακός ρυθμός).<sup>32,33,34,35</sup>

#### **Υπερηχοκαρδιογράφημα**

Το υπερηχοκαρδιογράφημα είναι μια γραφική απεικόνιση της καρδιακής κινητικότητας. Κατά τη διάρκεια της εξέτασης, ένας αισθητήρας, τοποθετείται στο στήθος του ασθενή. Ο αισθητήρας αυτός, εκπέμπει υπερηχητικές δονήσεις (ηχητικό κύμα υψηλής συχνότητας), ώστε ο γιατρός να μπορεί να δει το διάγραμμα της καρδιακής κινητικότητας. Το υπερηχοκαρδιογράφημα παρέχει εικόνες των βαλβίδων της καρδιάς και των θαλάμων, ώστε να αξιολογηθεί η δράση άντλησης της καρδιάς. Το υπερηχοκαρδιογράφημα συχνά συνδυάζεται με το Doppler υπερηχογράφημα για την αξιολόγηση της ροής του αίματος σε όλες τις βαλβίδες της καρδιάς.<sup>32,33,34,35</sup>

### **Βιοψία μυελού των οστών**

Η βιοψία του μυελού των οστών γίνεται για την αξιολόγηση της λειτουργίας του μυελού. Κατά την εξέταση, τοποθετείται μια βελόνα στο οπίσθιο οστό του ισχίου, από όπου αφαιρείται ένα δείγμα του μυελού των οστών. Στην περιοχή προστίθεται ένα τοπικό αναισθητικό, ή παυσίπονο, ώστε να μειωθεί το αίσθημα πόνου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.<sup>32,33,34,35</sup>

### **Οστική εξέταση**

Πρόκειται για μία σειρά ακτινογραφιών του κρανίου και των μακρών οστών σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό επίδρασης της νόσου.<sup>32,33,34,35</sup>

### **Οδοντιατρικές εξετάσεις**

Συστήνεται μια πλήρης οδοντιατρική εξέταση για τον έλεγχο ύπαρξης τυχών προβλημάτων, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν πιθανή μόλυνση μετά τη μεταμόσχευση.<sup>32,33,34,35</sup>

### **Άλλες εξετάσεις**

Σε ορισμένες περιπτώσεις, απαιτούνται και άλλες εξετάσεις, όπως για παράδειγμα: κολονοσκόπηση, τεστ ΠΑΠ, ή μαστογραφίες.<sup>32,33,34,35</sup>

## **A.2.ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Στο τέλος της προμεταμοσχευτικής αξιολόγησης και αφού έχουν βγει τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω εξετάσεων, ο ειδικός ιατρός αποφασίζει κατά πόσο ή όχι η μεταμόσχευση είναι η κατάλληλη θεραπεία για τον ασθενή.<sup>32,33,34,35</sup>

Ο στόχος των εξετάσεων πριν από τη μεταμόσχευση είναι η εξασφάλιση ότι ο ασθενής είναι σε θέση να υποστεί την μεταμόσχευση και να αναρρώσει χωρίς αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών.<sup>32,33,34,35</sup>

## **A.3.ΠΡΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΔΟΤΗ ΜΥΕΛΟΥ**

Για ασθενείς αλλογενούς μεταμόσχευσης, ο δότης μυελού οφείλει να περάσει μία ιατρική αξιολόγηση με πολλές από τις ίδιες εξετάσεις, ώστε να καθοριστεί ιατρικώς ως δότης.<sup>32,33,34,35</sup>

## **A.4.Η ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

### **Εισαγωγή**

Η λήψη μυελικού πολφού για τη μελέτη του στο οπτικό μικροσκόπιο ονομάζεται όπως αναφέρεται παραπάνω, βιοψία του μυελού των οστών. Πρόκειται για ένα πολύτιμο μέσο διερεύνησης και διάγνωσης των αιματολογικών νοσημάτων, των μεταστατικών νεοπλασμάτων και των κοκκιωματωδών νοσημάτων. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και άλλοι τρόποι μελέτης του, όπως η κυτταρογενετική και η κινητική μελέτη, η ιστοτοπική σήμανση, η μελέτη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και οι κλωνικές καλλιέργειες.<sup>36</sup>

Δείγματα μυελού των οστών για βιοψία λαμβάνονται με τους εξής τρόπους:

1. Με αναρρόφηση μυελού των οστών
2. Με ειδική βελόνη βιοψίας
3. Με ανοικτή χειρουργική επέμβαση<sup>36</sup>

### **A.4.1.ΒΙΟΨΙΑ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΜΕ ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ**

Αρχικά μικρή ποσότητα αναισθητικού φαρμάκου εισάγεται στο δέρμα με τη μορφή ένεσης για να κάνει την εξέταση λιγότερο επώδυνη. Απαιτούνται 1 με 2 λεπτά για να μουδιάσει η περιοχή.<sup>43</sup>

Μόλις το δέρμα μουδιάσει, μια ειδική βελόνα εισάγεται στο μυελό των οστών και λαμβάνεται μικρή ποσότητα αυτού μέσω αναρρόφησης μέσα στη σύριγγα. Κατά τη διάρκεια του μέρους αυτού της εξέτασης είναι πιθανό να σημειωθεί στιγμιαίος πόνος ή πίεση. Στη συνέχεια η βελόνα αποσύρεται και ολοκληρώνεται το μέρος αυτό της εξέτασης. Ο μυελός των οστών που βρίσκεται στη σύριγγα μοιάζει πολύ με αίμα.<sup>43</sup>

Η βιοψία του μυελού των οστών πραγματοποιείται μετά την αναρρόφηση. Στη βιοψία του μυελού των οστών χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες βελόνες αναρρόφησης κατασκευασμένες από στερεό ανθεκτικό υλικό, αποστειρωμένες (μιας χρήσης πλέον), που φέρουν στείλεό, ο οποίος εφαρμόζει καλά στη βελόνη, και επιπλέον κινητό ασφάλιστρο για τον έλεγχο εμβύθισής τους.<sup>36, 43</sup>

Οι θέσεις αναρρόφησης είναι οι ακόλουθες:

- Οπίσθια λαγόνιος άκανθα (η συχνότερη).
- Πρόσθια άνω λαγόνιος άκανθα(σε βρέφη και παιδιά κυρίως).
- Στέρνο (σε έφηβους και ενήλικες).
- Κνήμη (σε άτομα ηλικίας κάτω των 18 μηνών καθώς το οστό της κνήμης σκληραίνει μετέπειτα).<sup>36</sup>

#### **Α.4.2.ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

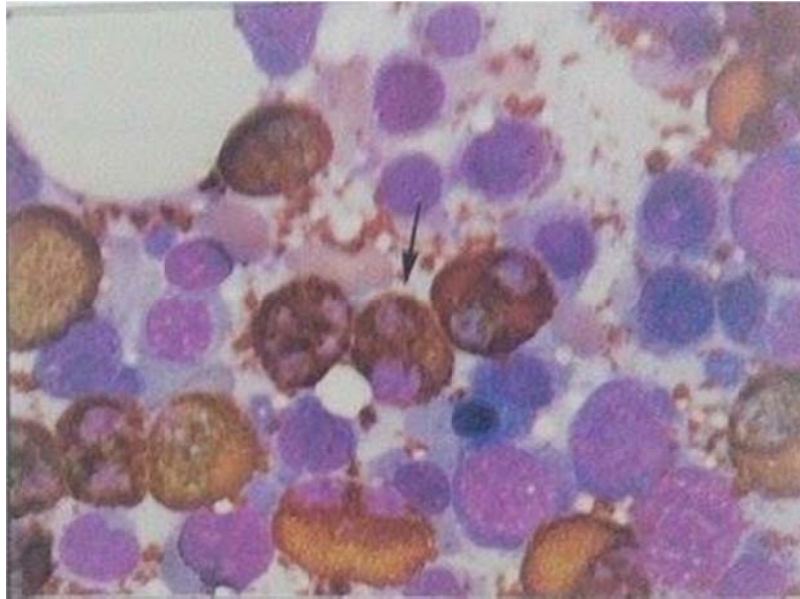
Η παρασκευή επιχρισμάτων μυελού των οστών γίνεται με τους ακόλουθους τρόπους:

1. Μετά την αναρρόφηση, πριν πήξει το δείγμα, τοποθετείται μία σταγόνα μυελού των οστών στο άκρο της αντικειμενοφόρου πλάκας και γίνεται επίστρωση με τον ίδιο τρόπο, όπως και στην επίστρωση επιχρισμάτων περιφερικού αίματος. Η παρουσία στο επίχρισμα μικρών τεμαχίων μυελού πιστοποιεί την επιτυχία της αναρρόφησης μυελού.<sup>36</sup>
2. Μετά την αναρρόφηση, τοποθετείται μια σταγόνα μυελού στο μέσο του πλάτους της αντικειμενοφόρου πλάκας και στο πρώτο τέταρτο του μήκους της. Αμέσως τοποθετείται δεύτερη αντικειμενοφόρος πλάκα επάνω στη σταγόνα, με αποτέλεσμα το αίμα να ωθείται στα πλάγια και στο κέντρο να παραμένουν κυρίως τα τεμάχια του μυελού. Χωρίς να ασκείται πίεση, σύρεται η μία πλάκα πάνω στην άλλη και με τον τρόπο αυτόν παρασκευάζεται επίχρισμα, στο οποίο τα τεμαχίδια του μυελού των οστών βρίσκονται στο κεντρικό τριτημόριο της αντικειμενοφόρου πλάκας.<sup>36</sup>

Η χρώση των επιχρισμάτων του μυελού των οστών γίνεται με τον ίδιο τρόπο και τις ίδιες χρωστικές, όπως και στην περίπτωση του περιφερικού αίματος (εικ.19). Η χρώση που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι η May Grunwald-Giemsa (εικ.20).



Απαραίτητη, όμως είναι η χρώση μερικών παρασκευασμάτων με κυανό της Πρωσίας για την εκτίμηση των αποθηκών σιδήρου του οργανισμού.<sup>36</sup>



ση

#### **A.4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Η μελέτη των επιχρισμάτων του μυελού των οστών απαιτεί μεγάλη εξοικείωση του παρατηρητή με την κυτταρική δομή, τη μορφή των στοιχείων και τη λειτουργία του μυελού. Η κυτταροβρίθεια του μυελού αλλά και ο αριθμός των κυττάρων ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με την ηλικία του ασθενή και γι' αυτό είναι σημαντικό να γίνεται γνωστή σε κάθε περίπτωση. Επίσης, σημαντικά στην ερμηνεία και τη διάγνωση είναι και η γνώση ιστορικού, τα αποτελέσματα της κλινικής εξέτασης και η εικόνα του περιφερικού αίματος.<sup>36</sup>



**ΕΙΚΟΝΑ 20.** Επίχρισμα μυελού των οστών με χρώση May Grunwald-Giemsa. (Α. Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, Αιματολογία II σελ.282)

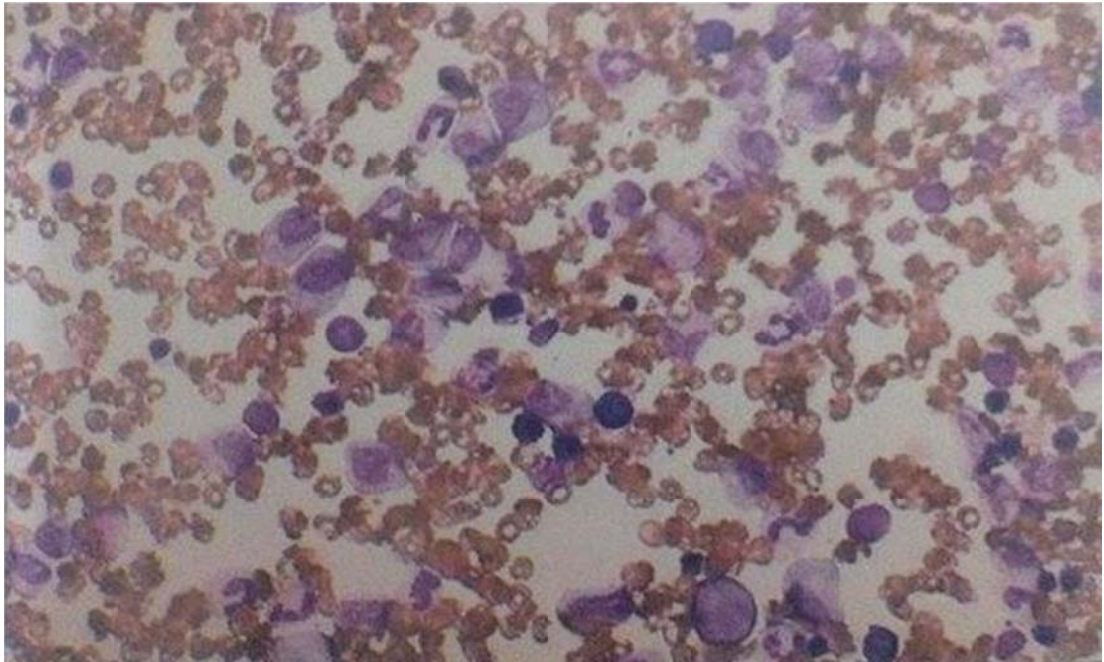
Τα επιχρίσματα του μυελού πρέπει να εξετάζονται με απόλυτα συστηματικό τρόπο. Η εξέταση αρχικά γίνεται με ξηρό αντεκειμενικό φακό μικρής μεγέθυνσης, συνήθως 10× ή 20×. Σε αυτό το πρώτο στάδιο της μελέτης εξετάζονται τα εξής:

- Η κυτταροβρίθεια των επιχρισμάτων.
- Η αναλογία λίπους/κυττάρων.
- Η ύπαρξη μεταστατικών κυττάρων, κυττάρων Reed-Sternberg, παρασίτων λεϊσμάνιας κ.λ.π.
- Η κατάληψη του μυελού από μονόμορφο κυτταρικό πληθυσμό με αντίστοιχη ελάττωση μίας ή και περισσότερων κυτταρικών σειρών (π.χ. οξείες λευχαιμίες).
- Η υπερπλασία κάποιας από τις φυσιολογικές κυτταρικές σειρές (π.χ. αιμολυτικές αναιμίες).
- Ο αριθμός των μακροφάγων και των μιτώσεων.
- Η ύπαρξη κοκκιωμάτων.<sup>36</sup>

Αφού εκτιμηθούν τα στοιχεία που προαναφέρθηκαν, η εξέταση συνεχίζεται με αντικειμενικό φακό μεγαλύτερης μεγέθυνσης, συνήθως 100× (εικ.21).<sup>36</sup>

Σε αυτή τη φάση η εξέταση του επίχρισματος περιλαμβάνει:

- Την εκτίμηση της εξέλιξης της ωρίμανσης των τριών μυελικών σειρών
- Την εκτίμηση της ποσοτικής εκπροσώπησης κάθε σειράς και της αναλογίας της κοκκιώδους προς την ερυθρά σειρά
- Τη μελέτη των ιδιαίτερων κυτταρομορφολογικών χαρακτηριστικών της κάθε σειράς
- Την ποσοτική εκτίμηση των παθολογικών κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού
- Την εξέταση των κυτταρομορφολογικών χαρακτηριστικών και την ποσοτική εκτίμηση των νεοπλασματικών μεταστατικών κυττάρων.<sup>36</sup>



**ΕΙΚΟΝΑ 21. Επίχρισμα μυελού των οστών με μεγέθυνση 100×. (Α. Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου, Αιματολογία II σελ.283)**

Το επόμενο στάδιο είναι η σύνταξη της έκθεσης του μυελογράμματος (εικ.22). Η αναλογία των κυττάρων του μυελού των οστών κυμαίνεται σε μεγάλα όρια και είναι φυσικό να έχουν διαγνωστική αξία μόνο οι μεγάλες αποκλίσεις. Η αναλογία της κοκκιώδους προς την ερυθρά σειρά έχει μεγάλο εύρος και κυμαίνεται από 2,5-15:1.

	(%)
Μυελοβλάστες	0,1–3,5
Προμυελοκύτταρα	0,5–5,0
Μυελοκύτταρα	
Ουδετερόφιλα	5,0–20,0
Ηωσινόφιλα	0,1–3,0
Βασεόφιλα	0,0–0,5
Πολυμορφοπύρρηνα	
Μεταμυελοκύτταρα	10,0–30,0
Ουδετερόφιλα	7,0–25,0
Ηωσινόφιλα	0,2–3,0
Βασεόφιλα	0,0–0,5
Λεμφοκύτταρα	5,0–20,0
Μονοκύτταρα	0,0–0,2
Μεγακαρνοκύτταρα	0,1–0,5
Πλασματοκύτταρα	0,1–3,5
Προερυθροβλάστες	0,5–5,0
Ερυθροβλάστες	
Πολυχρωματόφιλες ή ενδιάμεσες ορθοβλάστες	2,0–20,0
Οξύφιλες ή ώριμες ορθοβλάστες	2,0–10,0
Μακροφάγα	0,0–0,8
Δικτυοερυθροκύτταρα	0,1–2,0

## Β.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΗΛΑ ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

### Εισαγωγή

Υπάρχουν συνήθως τρεις συνιστώσες για την εξακρίβωση των ΗΛΑ που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της συμβατότητας :<sup>24</sup>

- Η ΗΛΑ τυποποίηση δότη και λήπτη  
Αυτό το βήμα περιλαμβάνει τον εντοπισμό των ΗΛΑ αλληλόμορφων.  
Μπορεί να περιλαμβάνει την ορολογική εξέταση ΗΛΑ ή την μοριακή (DNA) τυποποίηση.<sup>24</sup>

Τα μέλη της οικογένειας, που προσφέρονται να δωρίσουν μυελό των οστών ή κάποιο όργανο, πρέπει να εξεταστούν κατά ΗΛΑ για να διαπιστώσουν αν είναι συμβατοί με το συγγενή που χρειάζεται μεταμόσχευση.<sup>24</sup>

- Η ανίχνευση ΗΛΑ αντισωμάτων του δέκτη

Η εξέταση των HLA αντισωμάτων γίνεται στον δέκτη ώστε να καθορίσει αν υπάρχουν αντισώματα που θα στοχεύσουν κατά του μοσχευθέντος οργάνου ή ιστού . Μερικοί άνθρωποι έχουν ειδικά HLA αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί μετά από έκθεση σε ξένα αντιγόνα . Υπάρχουν τρεις βασικοί λόγοι για την έκθεση σε ξένα HLA αντιγόνα : σε εγκυμοσύνη , ιδιαίτερα πολύδυμες κυήσεις (από την έκθεση σε HLA αντιγόνα του πατέρα που έχουν περάσει στο έμβρυο) ,σε μεταγγίσεις αίματος ή αιμοπεταλίων , ή από προηγούμενη μεταμόσχευση (εις) οργάνου. <sup>24</sup>

Η εξέταση των HLA αντισωμάτων πρέπει να πραγματοποιείται σε τακτές περιόδους και να ανανεώνεται ώστε να καθοριστεί εάν το πρόσωπο ,που περιμένει για ένα διαθέσιμο συμβατό όργανο, έχει αναπτύξει επιπλέον HLA αντισώματα. <sup>24</sup>

Εκτιμάται ότι τα HLA αντισώματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν μετά τη μεταμόσχευση για να καθοριστεί εάν ο παραλήπτης έχει αναπτύξει νέα ή αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων, προς στο δότη. <sup>24</sup>

- Η διασταύρωση λεμφοκυττάρων (lymphocyte crossmatching) - Αυτό το βήμα εμφανίζεται αφού έχει εντοπιστεί ένας πιθανός δότης . Βοηθάει στο να καθοριστεί εάν ο παραλήπτης έχει αντισώματα που κατευθύνονται εναντίον των αντιγόνων που υπάρχουν στα λεμφοκύτταρα του δότη . Συγκεκριμένα, ο ορός του δέκτη αναμιγνύεται με τα λευκά κύτταρα του αίματος ( T και B λεμφοκύτταρα) του δότη. Οποιαδήποτε αντίδραση ανιχνευθεί ( θετικό αποτέλεσμα) σημαίνει ασυμβατότητα μεταξύ των δύο . Το αποτέλεσμα της διασταύρωσης πρέπει πάντα να ερμηνεύεται σε συνδυασμό με γνωστές πληροφορίες σχετικά με τα ιδιαίτερα αντισώματα του παραλήπτη και την HLA τυποποίηση του δότη .Η διασταύρωση αυτή γίνεται όταν ένας δυνητικός δότης έχει προσδιοριστεί μέσω της HLA τυποποίησης. Αυτή η εξέταση μπορεί να εφαρμοστεί ακριβώς πριν από τη μεταμόσχευση οργάνου για να εξασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει αναντιστοιχία . Στην περίπτωση της μεταμόσχευσης από ζώντα δότη , η διασταύρωση συμβατότητας γίνεται συνήθως περισσότερες από μία φορές μία όταν ο δότης έχει αρχικά αναγνωριστεί και μία πάλι λίγο πριν από την διαδικασία μεταμόσχευσης. <sup>24</sup>



## **B. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΗΛΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ**

Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό επιμέρους ΗΛΑ πολυμορφισμών ή «ΗΛΑ Τυποποίησης» έχουν εξελιχθεί πάρα πολύ από την ανακάλυψη του ανθρώπινου μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και έχουν αναπτυχθεί παράλληλα με τη διαλεύκανση της γενετικής πολυπλοκότητας αυτής της περιοχής, έτσι ώστε πάνω από 2000 αλληλόμορφα των ΗΛΑ τάξης I (A, B και C) και των τάξης II (DR, DQ και DP) θέσεων είναι τώρα γνωστά. Οι μέθοδοι για την ΗΛΑ τυποποίηση γίνονται είτε με βάση την ανίχνευση γενετικών διακυμάνσεων των εκφρασμένων μορίων ΗΛΑ (ορολογική τυποποίηση), ή τώρα σχεδόν αποκλειστικά, σε επίπεδο DNA αλληλουχίας (DNA Τυποποίηση).<sup>20</sup>

### **B.1. ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΗΛΑ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ**

#### **B.1.1. Αρχή της μεθόδου**

Η ένωση αντιγόνου (αντιγόνο ΗΛΑ κυτταρικής μεμβράνης) με ειδικό αντίσωμα (αντιορός ΗΛΑ) παρουσία περίσσειας συμπληρώματος προκαλεί βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης (οπές) και θάνατο του κυττάρου.<sup>20</sup>

#### **B.1.2. Η διαδικασία χωρίζεται σε πέντε στάδια.**

Στο πρώτο στάδιο απομονώνονται τα λεμφοκύτταρα από ολικό αίμα (γενική αίματος) που παίρνεται από τον δότη ή τον λήπτη της μεταμόσχευσης.<sup>20</sup>

Στο δεύτερο στάδιο απομονώνονται τα επιθυμητά λεμφοκύτταρα T ή B με την μέθοδο των ανοσομαγνητικών σφαιριδίων.<sup>20</sup>

Στο τρίτο στάδιο εφαρμόζεται η καθιερωμένη τεχνική της μικρολεμφοκυτταροτοξικότητας. Τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα αντιδρούν με αντισώματα αντι-ΗΛΑ που βρίσκονται μέσα στις οπές πλακών Terassaki. Ακολουθεί η προσθήκη συμπληρώματος. Όπου έχει γίνει η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος

γίνεται λύση της κυτταρικής μεμβράνης με την επίδραση συμπληρώματος. Στο τελικό διάλυμα με τα κατεστραμμένα κύτταρα προστίθεται κατάλληλη χρωστική.<sup>20</sup>

Στο τέταρτο στάδιο ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη χρωστική μικροσκοπούμε είτε σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού ή σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσεως. Το τελικό αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως 8, 6, 4, 2, 1 ανάλογα με το ποσοστό των νεκρών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο.<sup>20</sup>

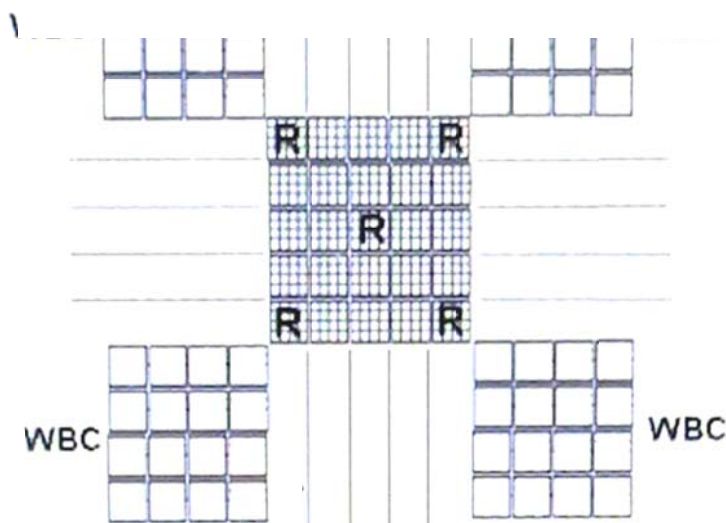
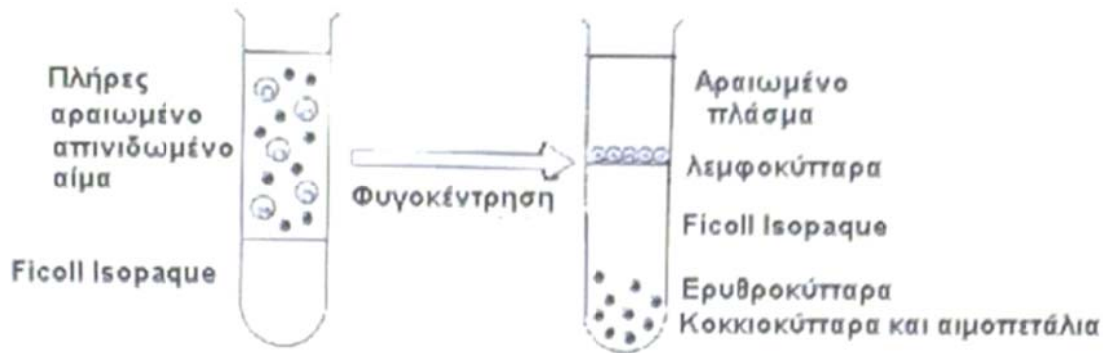
Στο πέμπτο στάδιο γίνεται η συνολική εκτίμηση των αντιγόνων HLA τάξεως I και II που υπάρχουν στον δότη ή λήπτη. Τα αποτελέσματα της μικροσκόπησης συμπληρώνονται σε ειδικά έντυπα.<sup>20</sup>

### **B.1.3. Αναλυτικά**

#### Πρώτο στάδιο.

Η απομόνωση των συνολικών λεμφοκυττάρων από δείγμα γενικής αίματος γίνεται με το αντιδραστήριο της φικόλης (εικ.23). Το Ficoll έχει μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρρηνα και έτσι αυτά καθιζάνουν στον πάτο. Αντιθέτως έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από τα λεμφοκύτταρα που μαζεύονται έτσι στην ενδιάμεση στιβάδα.<sup>20</sup>

Προκειμένου να απομονωθούν όσο τον δυνατόν περισσότερα λεμφοκύτταρα επαναλαμβάνεται η διαδικασία τουλάχιστον τρεις φορές. Στο τέλος των επαναλήψεων γίνεται μέτρηση των λεμφοκυττάρων σε πλάκα Neubauer (εικ.24). Επαρκής θεωρείται ο αριθμός των 3000 κυττάρων/μl. Αν ο αριθμός των λεμφοκυττάρων είναι μικρότερος τότε επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση με φικόλη.<sup>20</sup>



### Δεύτερο στάδιο.

Απομόνωση λεμφοκυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια.

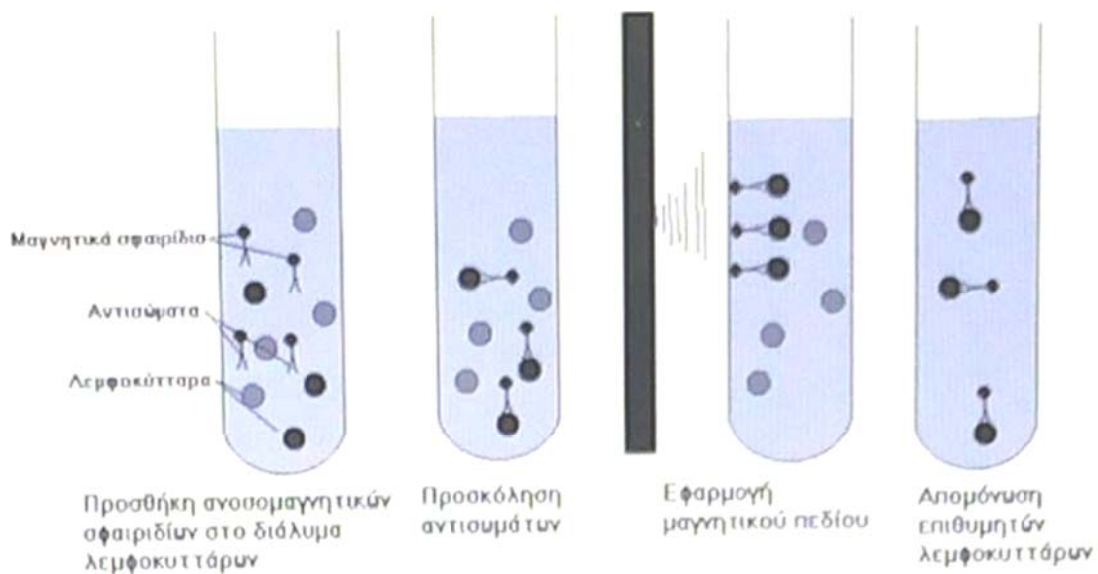
Η τεχνική η οποία εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια για την απομόνωση καθαρών υποπληθυσμών T και B λεμφοκυττάρων για την τυποποίηση των HLA τάξης I και II, βασίζεται στην χρησιμοποίηση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων (Beads)(εικ.25). Πρόκειται για μικροσκοπικά σφαιρίδια στην επιφάνεια των οποίων έχουν προσροφηθεί μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για τα επιθυμητά κύτταρα για απομόνωση. Συγκεκριμένα για την τυποποίηση των HLA τάξης I αντιγόνων στην επιφάνεια T-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια επενδυμένα με αντι-CD8 μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία μετά σύντομη επώαση με το εναιώρημα των λεμφοκυττάρων σχηματίζουν ρόδακες με τα CD8 T λεμφοκύτταρα.



Αντίστοιχα για τον προσδιορισμό των HLA τάξης II αντιγόνων στην επιφάνεια των T4-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της β-αλυσίδας των HLA τάξης II μορίων. Η απομόνωση των B κυττάρων μπορεί να γίνει με αρνητική επιλογή ή θετική επιλογή.

20

Στην αρνητική επιλογή απομονώνονται B κύτταρα απομακρύνοντας με το μίγμα αντισωμάτων όλα τα ανεπιθύμητα κύτταρα (T, NK, μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα) τα οποία επικολλούν σε αντίστοιχα μαγνητικά σφαιρίδια. Έτσι μένουν στο δείγμα ελεύθερα τα B κύτταρα. Αντίθετα στην θετική επιλογή απομονώνονται B κύτταρα με μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με αντι-CD19. Τα μαρκαρισμένα με μαγνητίζοντα αντισώματα κύτταρα T και B απομονώνονται στην συνέχεια με ειδικό σύστημα μαγνήτη. Τα μαγνητισμένα κύτταρα προσκολλώνται στα μαγνητισμένη επιφάνεια μετά από σύντομη επώαση. Κατόπιν με ειδικό πλυστικό διάλυμα απομακρύνονται τα μη μαγνητισμένα κύτταρα και έτσι λαμβάνονται τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα.<sup>20</sup>



σφαιρίδια.  
\_Immunol

Τρίτο στάδιο.

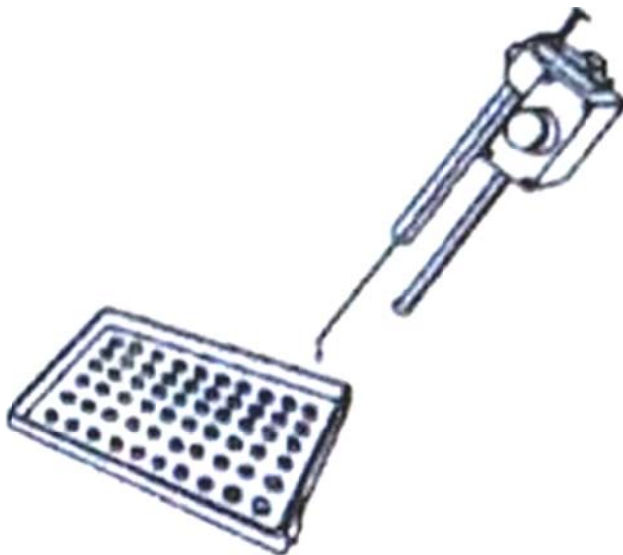
Δοκιμασία μικρολεμφοκυτταροτοξικότητας

Απαιτούνται:

α) κύτταρα: χρησιμοποιούνται τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος που έχουν απομονωθεί από την γενική αίματος με την μέθοδο της φικόλης. Επίσης στην περίπτωση πτωματικού δότη χρησιμοποιούνται λεμφοκύτταρα λεμφαδένος και σπληνός.<sup>20</sup>

β) αντιοροί HLA: κύρια πηγή οι εγκυμονούσες ή πολύτοκες γυναίκες, οι οποίες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι δυνατόν να ευαισθητοποιηθούν για παραγωγή αντι-HLA αντισωμάτων από τα πατρικής προέλευσης αντίγονα του εμβρύου. Η λήψη γίνεται μετά τον τοκετό. Άλλη πηγή αντιορών είναι ο πλακούντας ενώ μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν οροί πολυμεταγγισθέντων ατόμων ή ασθενείς που μεταμοσχεύθηκαν και απέρριψαν το μόσχευμα το οποίο δεν ήταν πλήρως ιστοσυμβατό προς το λήπτη και επέζησαν.<sup>20</sup>

γ) συμπλήρωμα: ως πηγή χρησιμοποιείται ορός κονίκλου. Ορός από 50 περίπου κονίκλους συλλέγεται και ελέγχεται για τοξικότητα και δραστηκότητα (τιτλοποίηση) με τη βοήθεια γνωστών αντιορών HLA και με κύτταρα γνωστού HLA φαινοτύπου.<sup>20</sup>



### Διαδικασία

Μετά την απομόνωση των λεμφοκυττάρων το μίγμα των απομονωθέντων κυττάρων διαμοιράζεται με ειδική μικροπιπέττα(εικ.26) σε οπές πλάκας Terasaki (εικ.27). Οι πλάκες Terasaki μοιάζουν με τις γνωστές πλάκες μικροτιτλοδότησης. Στον πυθμένα

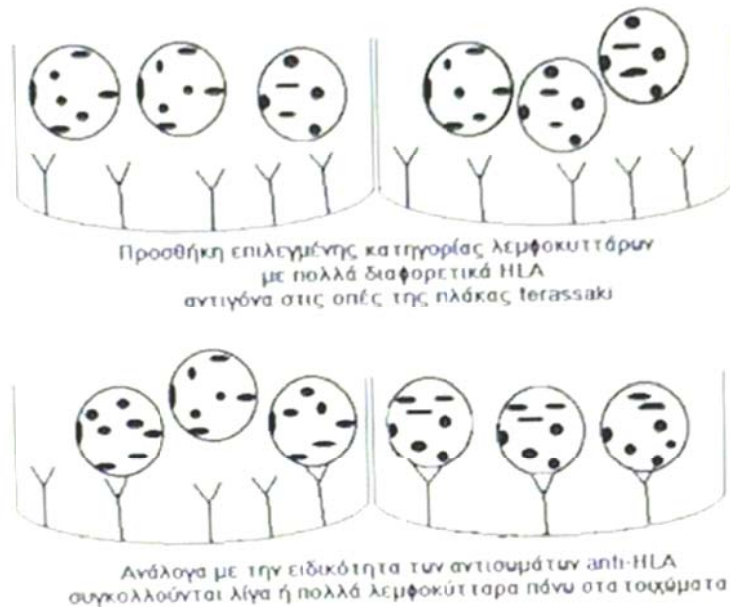
τους περιέχουν προσκολλημένα αντισώματα αντι-HLA (εικ.28). Κάθε οπή περιέχει διαφορετικά αντισώματα αντι-HLA, ενώ υπάρχουν διαφορετικές πλάκες για τα HLA τάξεως I και τάξεως II. Προκειμένου να γίνει σωστή HLA τυποποίηση, επιλέγονται σειρές αντισωμάτων, ώστε κάθε HLA ειδικότητα να αντιπροσωπεύεται τουλάχιστον δύο φορές.

Όπως είναι αναμενόμενο τα λεμφοκύτταρα που φέρουν στην κυτταρική τους μεμβράνη αντιγόνα HLA αντίστοιχα προς τα αντισώματα της πλάκας θα κολλήσουν πάνω στα τοιχώματα αυτής. Η προσκόλληση αυτή θα γίνει εμφανής μόνο όταν τα προσκολλημένα κύτταρα καταστραφούν από συμπλήρωμα που προστίθεται αμέσως μετά.<sup>20</sup>



Το συμπλήρωμα έχει την ικανότητα να τεμαχίζει τις κυτταρικές μεμβράνες κυττάρων εφόσον διαγνώσει την ένωση αντιγόνων της μεμβράνης τους με αντισώματα. Έτσι το συμπλήρωμα που προστίθεται μέσα στις οπές της πλάκας

σπάζει τις μεμβράνες των προσκολλημένων λεμφοκυττάρων και αφήνει άθικτες τις μεμβράνες των μη προσκολλημένων. Όσο περισσότερα νεκρά λεμφοκύτταρα υπάρχουν μέσα σε μία οπή της πλάκας terasaki τόσο μεγαλύτερη συγγένεια υπάρχει με τα συγκεκριμένα αντισώματα της πλάκας. Κατά συνέπεια και ο εξεταζόμενος άνθρωπος (δότης ή λήπτης) θα περιέχει τα αντίστοιχα αντιγόνα.<sup>20</sup>



un

### Τέταρτο στάδιο

#### **Μικροσκόπηση**

Ανάλογα με την χρωστική που θα τοποθετηθεί στις οπές της πλάκας Terasaki μετά από την καταστροφή των λεμφοκυττάρων από το συμπλήρωμα, η μικροσκόπηση θα γίνει είτε σε μικροσκόπιο ανάστροφου φθορισμού, είτε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσεως. Και τα δύο μικροσκόπια μας δίνουν την δυνατότητα της παρατήρησης ζωντανών κυττάρων. Η επιλογή του ενός ή του άλλου εξαρτάται, από τα αν θα χρησιμοποιήσουμε φθορίζουσα χρωστική ή όχι.<sup>20</sup>

### **Μικροσκόπηση σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού**

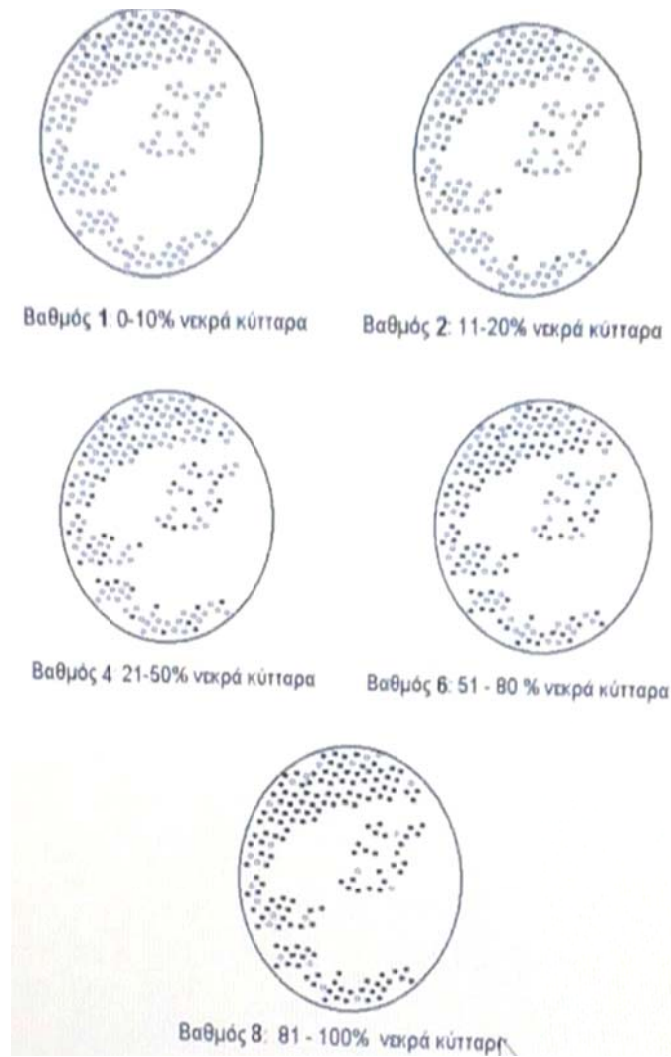
Στην περίπτωση αυτή μετά το συμπλήρωμα προστίθεται φθορίζουσα χρωστική (Acridine Orange/Ethidium Bromide). Η παρατήρηση γίνεται υποχρεωτικά σε σύντομο χρονικό διάστημα (όχι πέραν των 2 ωρών). Στο μικροσκόπιο ανεστραμμένου φθορισμού παρατηρούμε πράσινα και κόκκινα στίγματα. Τα κόκκινα στίγματα αντιπροσωπεύουν νεκρά κύτταρα που έχουν λυθεί με την επίδραση του συμπληρώματος.<sup>20</sup>

- Αν όλα τα στίγματα είναι κόκκινα (100 %) το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται με το βαθμό 8 (θετικό).
- Αν το 80% των στιγμάτων είναι κόκκινα το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως 6.
- Αν το 50% των στιγμάτων είναι κόκκινα το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως 4.
- Αν το 20% των στιγμάτων είναι κόκκινα το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως 2.
- Αν όλα τα στίγματα είναι πράσινα το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται με το βαθμό 1 (αρνητικό).<sup>20</sup>

Παράλληλα με τα δείγματα χρησιμοποιείται θετικός (8) και αρνητικός μάρτυρας (1). Τα αποτελέσματα αναγράφονται σε ειδικές φόρμες όπου αναγράφονται τα αντιγόνα που παρατηρήθηκαν σε κάθε οπή χαρακτηρίζοντας την αντίδραση με τους αριθμούς 8-1. Κάθε οπή αντιστοιχεί ενδεχομένως σε περισσότερα του ενός αντιγόνα. Ταιριάζοντας τις θετικές απαντήσεις βρίσκουμε τα HLA αντιγόνα του δότη ή του λήπτη.<sup>20</sup>

### **Μικροσκόπηση σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσεως**

Εδώ προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι μη φθορίζουσα χρωστική (stain fix). Κατά την μικροσκόπηση παρατηρούνται και εδώ δύο ειδών κύτταρα: νεκρά και ζωντανά. Τα νεκρά φαίνονται με γεμάτο (σκούρο) πρωτόπλασμα ενώ τα ζωντανά με διαφανές διαθλαστικό πρωτόπλασμα (εικ.29).<sup>20</sup>



Immuno

### Πέμπτο στάδιο

#### **Εκτίμηση αποτελεσμάτων HLA σε πλάκα Terasaki**

Όπως είπαμε οι πλάκες Terasaki είναι μικρές πλάκες που διαθέτουν πολλά μικρά βυθίσματα όλα επικαλυμμένα με αντιγόνα HLA. Υπάρχουν ξεχωριστές πλάκες για τα αντιγόνα HLA A, B, C και τα αντιγόνα DR, DQ. Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται παραδείγματα ανίχνευσης HLA A,B,C και HLA DR, DQ.18.15). Σε κάθε πλάκα υπάρχουν δύο θέσεις για τον θετικό (POSitive) και τον αρνητικό (NEGative) μάρτυρα. Για να θεωρείται η πλάκα κατάλληλη θα πρέπει ο θετικός μάρτυρας να έχει βαθμολογία 8 και ο αρνητικός 1. Τα βυθίσματα δεν είναι αποκλειστικά ειδικά

για ένα μόνο αντιγόνο αλλά υπάρχουν βυθίσματα που αντιστοιχούν σε δύο, τρία ή περισσότερα αντιγόνα. Επιπλέον κάθε αντιγόνο μπορεί να υπάρχει σε πολλά διαφορετικά βυθίσματα, είτε μόνο του, είτε συνυπάρχοντας με πολλά διαφορετικά αντιγόνα. Ο συνδυασμός των αντιγόνων οφείλεται σε τεχνικούς λόγους κατά το στάδιο παρασκευής των πλακών. Απαραίτητα κάθε πλάκα συνοδεύεται από έντυπο που περιέχει τις απαραίτητες πληροφορίες για κάθε βύθισμα. Η ποικιλία των αντιγόνων βοηθά, τον εργαστηριακό που τα παρατηρεί, στο μικροσκόπιο να συνδυάσει τα αποτελέσματα από πολλά βυθίσματα και να βρει έτσι τα αντιγόνα που υπάρχουν, στον συγκεκριμένο άνθρωπο. Επιπλέον η ύπαρξη του ίδιου αντιγόνου σε πολλά βυθίσματα επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα που εκδίδονται περιέχουν όχι μόνο τα αντιγόνα αλλά και την βαθμολογία που αντιστοιχεί σε αυτά.

20

## **B.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

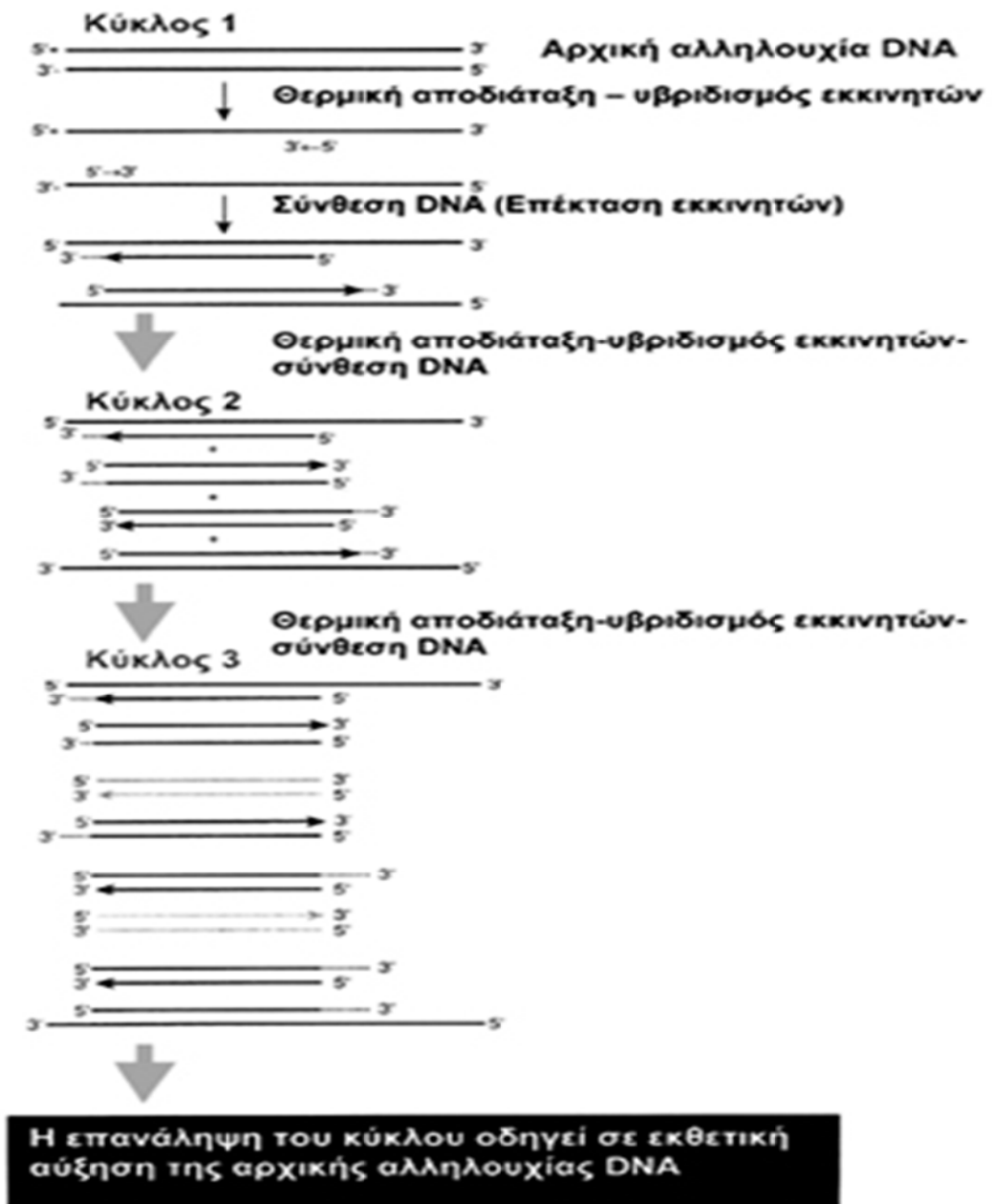
Ο τρόπος σύνδεσης των αντισωμάτων και οι αντιδράσεις των λεμφοκυττάρων όταν αυτά ενεργοποιούνται από ανόμοια HLA αντιγόνα αποτέλεσαν για πολύ καιρό μοναδικές αποδείξεις του μεγάλου πολυμορφισμού που χαρακτηρίζει το HLA σύστημα. Με την πρόοδο της γονιδιακής κλωνοποίησης και της ανεύρεσης των αλληλουχιών των βάσεων του DNA διαπιστώθηκε ότι ο πολυμορφισμός του HLA συστήματος προέρχεται τελικά από τις διαφορές στις αλληλουχίες αυτές που εντοπίζονται στις μεταβλητές περιοχές των HLA μορίων. Στα HLA τάξης II γονίδια οι μεταβλητές περιοχές εντοπίζονται στο εξόνιο 2, ωστόσο πολυμορφικές περιοχές επίσης ανευρίσκονται στα ιντρόνια και τις γειτονικές περιοχές των γονιδίων. Τα τάξης II αντιγόνα μπορούν να χαρακτηριστούν ως μια «συρραφή» των συνδυασμών αυτών των πολυμορφικών αλληλουχιών. Κατά συνέπεια, πολλά αντιγόνα μοιράζονται κάποιες από τις κοινές αλληλουχίες, γεγονός στο οποίο αποδίδεται το φαινόμενο των διασταυρούμενων αντιδράσεων των αντιωρών που χρησιμοποιούνται στην ορολογική τυποποίηση, και πιο πρόσφατα οι διασταυρούμενοι υβριδισμοί των τάξης II ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μοριακές τεχνικές.<sup>6</sup>

### B.2.1. PCR

Είναι μία τεχνική, που επωφελείται της ευκολίας παραγωγής συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό περιοχών DNA για τις οποίες υπάρχει κάποια γνωστή αλληλουχία (εικ.30). Συνίσταται από επαναληπτικούς κύκλους αντιγραφής DNA, αρχίζοντας από μία μήτρα DNA και δύο συνθετικούς εκκινητές που συνθέτουν προς την αντίθετη κατεύθυνση, ο ένας προς τον άλλο. Κάθε κύκλος αποτελείται από άνοδο της θερμοκρασίας για τήξη του DNA και στην συνέχεια πτώση της θερμοκρασίας για συστοιχισμό των εκκινητών στις αντίστοιχες μήτρες και σύνθεση νέου DNA. Σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA ανάμεσα από τους δύο εκκινητές διπλασιάζεται.<sup>16,22</sup>

Μπορεί έτσι επιλεκτικά να πολλαπλασιαστεί μία μικρή περιοχή από ένα πολύπλοκο δείγμα DNA (η μήτρα μπορεί να είναι συνολικό γενωμικό DNA). Αυτή η κυκλική διαδικασία (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης = polymerase chain reaction = PCR) θα ήταν ιδιαίτερα επίπονη με τις κοινές DNA πολυμεράσες, οι οποίες αποδιατάσσονται στις ψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την τήξη του DNA - θα χρειαζόταν προσθήκη νέου ενζύμου σε κάθε κύκλο. Το πρόβλημα ξεπεράστηκε με την απομόνωση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών (π.χ. Taq polymerase) από μικροοργανισμούς που ζουν σε θερμές πηγές. Η διεκπεραίωση της PCR στην πράξη απλοποιήθηκε με την ανάπτυξη ειδικών κυκλικά προγραμματιζόμενων θερμοεπωαστών (thermal cyclers or PCR machines).<sup>16,22</sup>





δίον της

Υπάρχουν πολλαπλά παραδείγματα για την χρησιμότητα της PCR:

(1) ο γρήγορος προσδιορισμός της αλληλουχίας σημειακών μεταλλαγών σε αλληλόμορφα ενός γονιδίου (του οποίου έχουμε την αλληλουχία).

(2) η διάγνωση σε κλινικά δείγματα κάποιου παθογόνου σε ελάχιστες ποσότητες, π.χ. του HIV στα αρχικά στάδια της μόλυνσης.

(3) η αναγνώριση (και καταδίκη) εγκληματιών από ένα ελάχιστο δείγμα που άφησαν στον τόπο του εγκλήματος (π.χ. μία τρίχα!).

(4) η μελέτη αλληλουχιών DNA από εκλιπόντα είδη ξεκινώντας από υπολείμματα του γονιδιώματος σε ταριχεύματα!<sup>16,22</sup>

Εκτός από τα παραπάνω εξειδικευμένα παραδείγματα της χρησιμότητας της PCR, η μέθοδος αυτή προσφέρει ιδιαίτερη ευελιξία στην *in vitro* μεταλλαξογένεση / σύνθεση γονιδίων. Μπορεί να απομονωθεί ένα οποιοδήποτε γονιδιακό τμήμα χρησιμοποιώντας PCR εκκινήτες από τα άκρα του. Με παρόμοιο τρόπο μπορούν να κατασκευαστούν ελλείμματα οποιωνδήποτε περιοχών.<sup>16,22</sup>

### **B.2.2. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

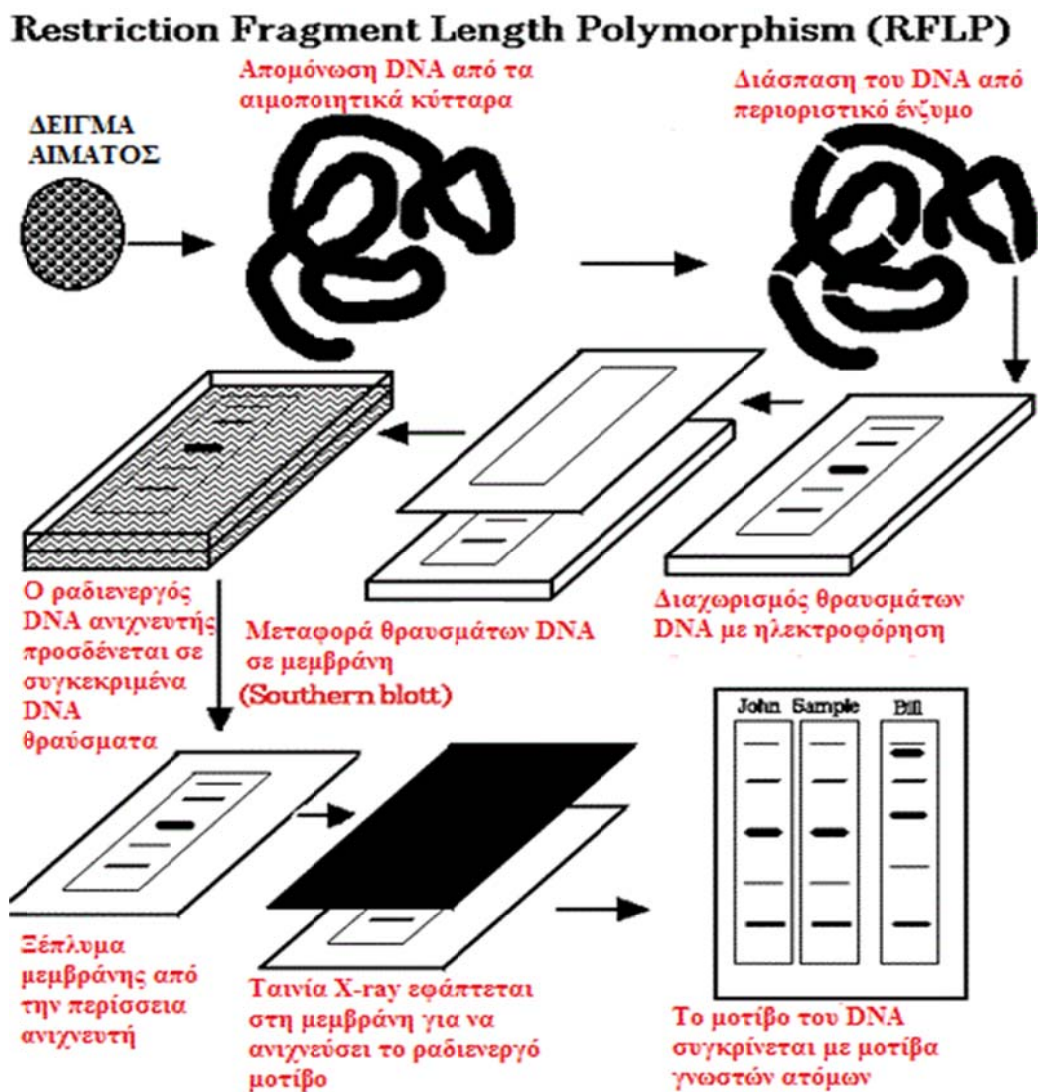
Με την κλωνοποίηση πολλών τυχαίων περιοχών ενός γονιδιώματος (π.χ. του ανθρώπου) και την χρησιμοποίησή τους σαν ανιχνευτές σε γενωμικά Southern blots διαπιστώθηκε ότι μία περιοχή μπορεί να μην δείχνει το ίδιο πρότυπο θραυσμάτων περιορισμού σε όλα τα άτομα ενός πληθυσμού - αυτή η ποικιλομορφία λέγεται restriction fragment length polymorphism ή RFLP. Το αίτιο αυτού του φαινομένου είναι η τυχαία ποικιλομορφία της DNA αλληλουχίας μιας περιοχής (>1 διαφορά ανά 1000 bp συγκρίνοντας δύο διαφορετικά αλληλόμορφα της ίδιας αλληλουχίας στον άνθρωπο), η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι χωρίς φαινοτυπικό αποτέλεσμα. Μία τέτοια σιωπηλή ποικιλομορφία μπορεί να γίνει ορατή με Southern blot όταν συμπέσει με κάποια περιοριστική θέση και έτσι την καταστρέψει (ή αντίστροφα όταν δημιουργήσει νέα περιοριστική θέση σε κάποιο σημείο). Μία RFLP είναι στην ουσία γενετικός δείκτης, μια και προέρχεται από ένα συγκεκριμένο σημείο σε ένα χρωμόσωμα. Έτσι η συχνότητα ανασυνδυασμού μεταξύ αλληλομόρφων μιας RFLP και ενός γονιδίου (με ορατό φαινότυπο) ή μεταξύ δύο διαφορετικών RFLPs μας δίνει πληροφορία για την σύνδεση των δύο τόπων. Τα μεγάλα γονιδιώματα των θηλαστικών σε συνδυασμό με την ανεφικτότητα κλασικής γενετικής ανάλυσης μεγάλης κλίμακας καθιστούν την κατασκευή γενετικών χαρτών

δύσκολη. Με την χαρτογράφηση RFLPs έχουν κατασκευασθεί λεπτομερείς γενετικοί χάρτες.<sup>14</sup>

Η μέθοδος του πολυμορφισμού του μήκους των θραυσμάτων DNA μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (**restriction fragment length polymorphism, RFLP**) αναφέρεται στην ποικιλομορφία που παρατηρείται σε ομόλογες αλληλουχίες DNA και εντοπίζεται με την παρουσία διαφορετικών μηκών τμημάτων DNA μετά την πέψη του με περιοριστικά ένζυμα (εικ.31). Τα περιοριστικά ένζυμα (ή ενδονουκλεάσες) «κόβουν» το DNA στα σημεία που συναντούν ειδικές αλληλουχίες μήκους 5-6 βάσεων, που είναι γνωστές ως περιοριστικές θέσεις. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες (restriction enzymes) αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA, τις θέσεις περιορισμού (restriction sites), και υδρολύουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και στις δύο αλυσίδες του DNA στη θέση αναγνώρισης ή κοντά σε αυτήν, δημιουργώντας περιοριστικά θραύσματα (restriction fragments). Οι θέσεις περιορισμού είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες συνήθως είναι παλίνδρομες και τυπικά έχουν μήκος 4-8 bp. Ο τεμαχισμός ενός μορίου DNA με ένα συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο, οδηγεί στην παραγωγή ενός χαρακτηριστικού και επαναλήψιμου συνόλου θραυσμάτων, το οποίο αντανακλά τη συχνότητα και τη θέση των αλληλουχιών αναγνώρισης του ενζύμου αυτού. Τα περισσότερα περιοριστικά ένζυμα έχουν απομονωθεί από βακτήρια, στα οποία δρουν ως μηχανισμός προστασίας αυτών από ιικές μολύνσεις, μέσω ενός συστήματος μεθυλίωσης. Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν τη δραστηριότητα των περιοριστικών ενδονουκλεασών, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται το pH, η ιοντική συγκέντρωση στο διάλυμα αντίδρασης (buffer) και η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η αντίδραση πέψης. Στη μοριακή γενετική, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες βρίσκουν εφαρμογή σε θέματα σχετικά με τα περιοριστικά θραύσματα ποικίλου μήκους του DNA (RFLPs). Αλλαγή της αλληλουχίας στο σημείο αναγνώρισης του ενζύμου, όπως για παράδειγμα η αντικατάσταση ή η απαλοιφή μιας βάσης, προκαλεί τον σχηματισμό θραυσμάτων διαφορετικών μεγεθών.<sup>14</sup>

Μία κύρια χρήση της γενετικής χαρτογράφησης με RFLPs είναι η προγεννητική διάγνωση γενετικών ασθενειών. Ορισμένες τέτοιες ασθένειες (π.χ. ασθένεια του

Huntington) έχουν χαρτογραφηθεί κοντά σε κάποια RFLP και η παρουσία ενός αλληλομόρφου της συγκεκριμένης RFLP είναι ενδεικτική για την παρουσία του μεταλλαγμένου γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παθολογική κατάσταση. Για τέτοια διάγνωση δεν είναι απαραίτητο να έχει κλωνοποιηθεί, το υπεύθυνο για την ασθένεια γονίδιο, απλά να έχει χαρτογραφηθεί γενετικά. Απαιτείται όμως γνώση της γενεαλογίας του πιθανού πάσχοντα / φορέα, ώστε να μπορεί να συσχετισθεί το αλληλόμορφο της RFLP με τον φαινότυπο της ασθένειας. Φυσικά πάντα υπάρχει (μικρή) πιθανότητα λάθος διάγνωσης, γιατί μπορεί να έχει λάβει χώρα ανασυνδυασμός μεταξύ του RFLP τύπου και του γονιδίου της ασθένειας (γι' αυτό επιλέγονται RFLPs που είναι στενά συνδεδεμένα με το γονίδιο υπό έρευνα).<sup>14</sup>



(m)

## **Ανίχνευση των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο(RFLPs)**

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει:

1. Την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα.
2. Τη διάσπαση του DNA με περιοριστικό ένζυμο Taq I και το διαχωρισμό των τμημάτων DNA που προέκυψαν από τη διάσπαση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης
3. Τη μετουσίωση του DNA πάνω στην πηκτή και την αποτύπωση του κατά Southern σε νάλον μεμβράνη
4. Διαδοχικούς υβριδισμούς της μεμβράνης με DNA ανιχνευτές, ισοτοπικά σημασμένους με (α-<sup>32</sup>P)dCPT, για την DRB1,DQB1 και DQA1 γονιδιακή θέση
5. Την αποκάλυψη του υβριδισμού με αυτοραδιογραφία <sup>14</sup>

### **B.3. Τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλίων με την RFLP μέθοδο.**

Η πρώτη μοριακή μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι η ανίχνευση των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (Restriction Fragment Length Polymorphism,RFLP). Η ανάλυση των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στη διερεύνηση του πολυμορφισμού των HLA τάξης II αντιγόνων από τον Wake και τους συνεργάτες του, το 1982. Η βελτίωση και επέκταση της RFLP ανάλυσης ώστε να συμπεριλάβει την HLA-DR,DQ και DP τυποποίηση και η βαθμιαία κλινική αξιολόγηση της μεθόδου κυριάρχησε στο 10<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο Ιστοσυμβατότητας και οδήγησε στην ευρεία αποδοχή της, από το 1988. <sup>14</sup>

Για την HLA RFLP τυποποίηση εφαρμόστηκε η τεχνική Southern blotting μετά από κατάτμηση του γονιδιωματικού DNA των υπό μελέτη ατόμων με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα και στη συνέχεια υβριδισμός με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές. <sup>14</sup>

Το περιοριστικό ένζυμο Taq I που προτιμάται από πολλούς ερευνητές διότι επιτρέπει το διαχωρισμό της πλειοψηφίας των DRB-DQB-DQA απλοτύπων. <sup>14</sup>

Ένας ακόμη λόγος για την επιλογή αυτού του ενζύμου είναι ότι αναγνωρίζει την αλληλουχία (5-TCGA-3) πάνω στο DNA, η οποία περιέχει το δινουκλεοτίδιο CpG, το οποίο περιέχεται σε πολλές θέσεις στο ανθρώπινο DNA οπότε έτσι ανιχνεύονται οι περισσότεροι πολυμορφισμοί.<sup>14</sup>

Οι κύριες εφαρμογές της RFLP ανάλυσης περιλαμβάνουν την επιλογή των DR/DQ συμβατών δοτών για την αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών, την τυποποίηση υποψηφίων ληπτών νεφρικού μοσχεύματος, καθώς και την αναδρομική τυποποίηση των πτωματικών δοτών. Επίσης, εφαρμόζεται σε ανθρωπολογικές μελέτες και σε μελέτες συσχέτισης των HLA τάξης II αντιγόνων με διάφορα νοσήματα, έχοντας εντυπωσιακά αποτελέσματα.<sup>14</sup>

#### **B.4. Τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλίων με τη χρήση της PCR.**

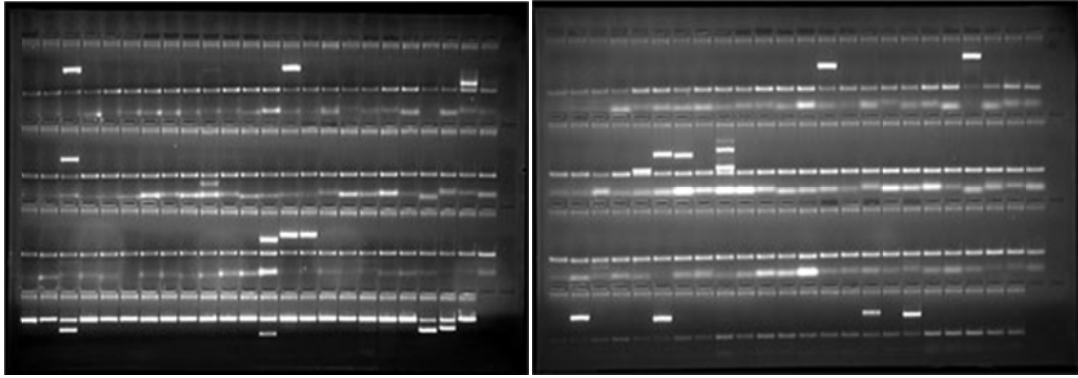
Η τυποποίηση των HLA αντιγόνων με την αναπτύχθηκε παράλληλα με κάθε άλλη βιολογική εφαρμογή της μεθόδου. Παρόλα αυτά, ο εξαιρετικά μεγάλος πολυμορφισμός των HLA γονιδίων αποτέλεσε πρόκληση για τους μοριακούς βιολόγους. Η PCR προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα στη μοριακή τυποποίηση των HLA αντιγόνων γιατί παράγει σημαντική ποσότητα του επιλεγμένου HLA γονιδίου ενώ συγχρόνως απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος. Το προϊόν της PCR αντίδρασης μπορεί μετά να χρησιμοποιηθεί με διάφορες μεθόδους ώστε να ανιχνευτούν οι εσωτερικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων επομένως και των HLA αλληλίων.<sup>14</sup>

Συγκεκριμένα, η μέθοδος περιλαμβάνει ένα κατάλογο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ώστε να επιτευχθεί η μεγέθυνση των HLA αλληλουχιών-στόχων. Τα ολιγονουκλεοτίδια είναι μικρά κομμάτια μονόκλωνου DNA, μήκους 18-24 bp συνήθως νουκλεοτιδίων συμπληρωματικά των γνωστών πολυμορφικών αλληλουχιών των HLA αλληλίων. Οι αλληλουχίες-στόχοι που μεγεθύνονται προέρχονται από τα πολυμορφικά εξόνια των HLA γονιδίων που είναι το εξόνιο 2 για τα HLA τάξης II και τα εξόνια 2 και 3 με ή χωρίς το ιντρόνιο 2 των HLA τάξης I γονιδίων.<sup>14</sup>

Μετά από 30 κύκλους των 3 σταδίων που περιλαμβάνουν α) τη μετουσίωση του DNA στόχου, κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο μετά από επώαση στους 94°C, β) τη σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών (primers) στις δύο πλευρές του στόχου στους αντίστοιχους κλώνους DNA στους 55°C και γ) την επέκταση, δηλαδή τη σύνθεση νέου DNA με τη δράση της DNA πολυμεράσης και συγκεκριμένα χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση που προσθέτει συμπληρωματικές βάσεις δεσοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε αφετηρίας στους 72° C, το προϊόν της αντίδρασης μεταφέρεται πάνω σε μεμβράνη, όπου ακινητοποιείται και υβριδίζεται με ειδικά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια για την κάθε ειδικότητα, σημασμένα ισοτοπικά ή χημικά. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται εύκολα με αυτοραδιογραφία ή ενζυμική χρωματομετρική μέθοδο. Επειδή όμως απαιτείται μεγάλος αριθμός ολιγονουκλεοτιδίων (20-60) ,έχουν προταθεί διάφορα σχήματα συνδυασμού των ολιγονουκλεοτιδίων ανάλογα με το είδος της πληροφορίας που απαιτείται. Ωστόσο λόγω των πολλών συνδυασμών ετεροζυγωτικών φαινοτύπων που μοιράζονται τις ίδιες πολυμορφικές αλληλουχίες η τυποποίηση πραγματοποιείται με αμφιβολία και πολύ συχνά η μέθοδος αποτυγχάνει.

14

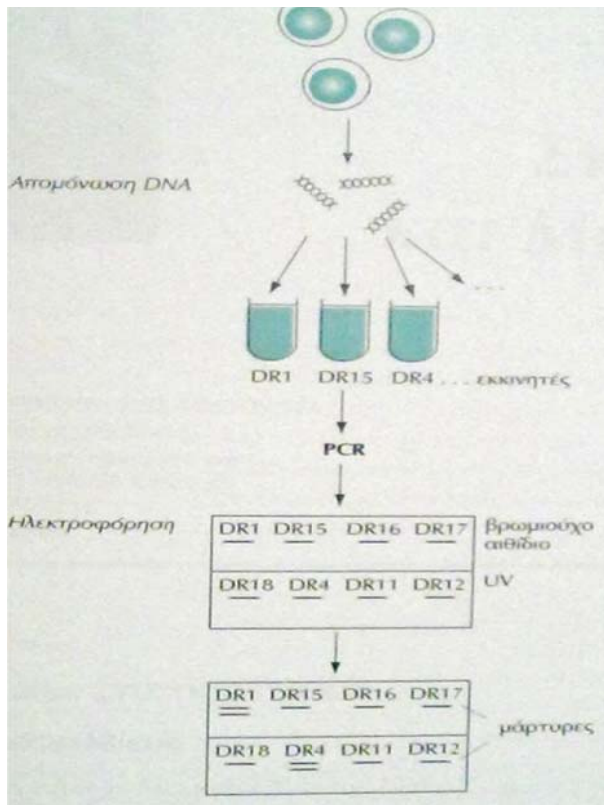
Η παρατήρηση της παρουσίας μοναδικών αλληλουχιών για κάθε DR και DQ αλληλίο έδωσε στο εργαστήριο την αποτελεσματικότερη και ταχύτερη γονοτυπική μέθοδο. Σχεδιάστηκαν, έτσι, ολιγονουκλεοτιδικές αφετηρίες (primers) με βάση αυτές τις αλληλουχίες, ώστε κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες υβριδισμού να παράγεται μεγεθυμένο προϊόν μόνο όταν έχει επιτευχθεί απόλυτο ταίριασμα με το υπό εξέταση δείγμα DNA. Ως εκτούτου η ειδικότητα της τυποποίησης είναι μέρος της PCR αντίδρασης και δεν απαιτούνται νέοι υβριδισμοί με ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για την αναγνώριση του αλληλίου. Μετά τη μεγέθυνση το δείγμα ηλεκτροφορεύεται και εξετάζεται μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο για την παρουσία ή απουσία του PCR προϊόντος. Η μέθοδος αυτή που καλείται ως HLA τυποποίηση με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ειδικές ολιγονουκλεοτιδικές αφετηρίες (PCR-SSP) μπορεί να αναγνωρίζει τα ορολογικά ανιχνευόμενα αλληλία καθώς και τους πολυάριθμους υποτύπους αυτών (εικ.32.1,32.2,33).<sup>14</sup>



P

conten  
lan

nte  
an





## **B.5. Τυποποίηση των HLA τάξης I αλληλίων με μοριακές τεχνικές.**

Μόλις πρόσφατα οι πρόοδοι της PCR για την τυποποίηση των HLA τάξης II αλληλίων εφαρμόστηκαν και για τα HLA τάξης I. Η φαινοτυπική τυποποίηση των τάξης II ήταν πραγματικά περισσότερο προβληματική από αυτήν των τάξης I, με αποτέλεσμα περισσότερες προσπάθειες να καταναλωθούν στην εφαρμογή της τεχνολογίας του DNA για την ομάδα των HLA τάξης II. Αντίθετα η HLA τάξης I τυποποίηση παρουσιάζει προβλήματα για τρεις λόγους:

1. Η ύπαρξη πολυμορφισμών στα εξόνια 2 και 3 των τάξης I γονιδίων
2. Οι πολυμορφικές αλληλουχίες των τάξης I γονιδίων είναι διάσπαρτες και όχι εντοπισμένες και
3. Η αφθονία των τάξης I ψευδογονιδίων μπορεί να συγκαλύψει την ανάλυση των HLA-A,B και C PCR προϊόντων.<sup>14</sup>

Οι μοριακές τεχνικές της τυποποίησης των HLA αντιγόνων προσφέρουν την ακριβέστερη στρατηγική αναγνώρισης του εκτεταμένου πολυμορφισμού που χαρακτηρίζει τα μόρια αυτά. Η πρόκληση για τις μοριακές μεθόδους είναι να εξασφαλίσουν ένα αποτέλεσμα σε σύντομο χρόνο και με το ελάχιστο κόστος, έτσι ώστε τα οφέλη της ακριβούς μοριακής τυποποίησης να εφαρμοστούν στις κρίσιμες και τεχνικά απαιτήσεις του προμεταμοσχευτικού ελέγχου.<sup>14</sup>

## **Γ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ANTI-HLA (κυτταροτοξικών) ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.**

Στον ορό 20-30% των υποψήφιων για μεταμόσχευση ασθενών ανιχνεύονται αντί-HLA αντισώματα. Τα αντισώματα, που στρέφονται κατά άλλων μη HLA αντιγόνων του μοσχεύματος κυκλοφορούν επίσης και στον ορό αυτών των ασθενών. Τα αυτοαντισώματα δεν αποτελούν αιτία απόρριψης του μοσχεύματος, για αυτό και η παρουσία τους δεν αποτελεί αντένδειξη για μεταμόσχευση.<sup>16</sup>

Ο έλεγχος της ευαισθητοποίησης των υπό μεταμόσχευση υποψήφιων ληπτών διακρίνεται σε γενικό, κατά τον οποίο ελέγχεται η παρουσία κυτταροτοξικών αντισωμάτων, και σε ειδικό, ο οποίος αφορά την διασταύρωση του ορού του λήπτη

με λεμφοκύτταρα ενός συγκεκριμένου δότη για την ανίχνευση αντισωμάτων ειδικών έναντι των HLA-αντιγόνων του τελευταίου (δοκιμασία διασταύρωσης, crossmatch).<sup>16</sup>

### **Γ.1. Γενικός έλεγχος.**

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των αντί-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) T και B – κυττάρων, τυχαίων ατόμων γνωστής αντιγονικής HLA-ταυτότητας. Η αντίδραση των λεμφοκυττάρων του panel με τα αντί-HLA αντισώματα του ασθενούς, παρουσία του συμπληρώματος, προκαλεί λύση των λεμφοκυττάρων (θετική αντίδραση) που γίνεται ορατή με την προσθήκη εμβίου χρώσεως (trypan blue ή eosin). Η αντίδραση αυτή είναι μια πρώτη προσέγγιση του βαθμού ευαισθητοποίησης του ασθενούς.<sup>16</sup>

Η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι διάφορων HLA-αντιγόνων κατέστησε δυνατή την ανάπτυξη μεθόδων, με τις οποίες προσδιορίζεται άμεσα το HLA-αντιγόνο που αποτελεί τον στόχο ενός αντί-HLA αντισώματος. Τέτοια είναι η μέθοδος στερεάς φάσης ELISA. Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι ανιχνεύει αντισώματα έναντι των τάξης I HLA-αντιγόνων, ανεξάρτητα από την ικανότητά τους να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα. Επίσης έχει την δυνατότητα να ανιχνεύει την ειδικότητα των αντί-HLA αντισωμάτων σε πολυευαισθητοποιημένους ασθενείς (>80%).<sup>16</sup>

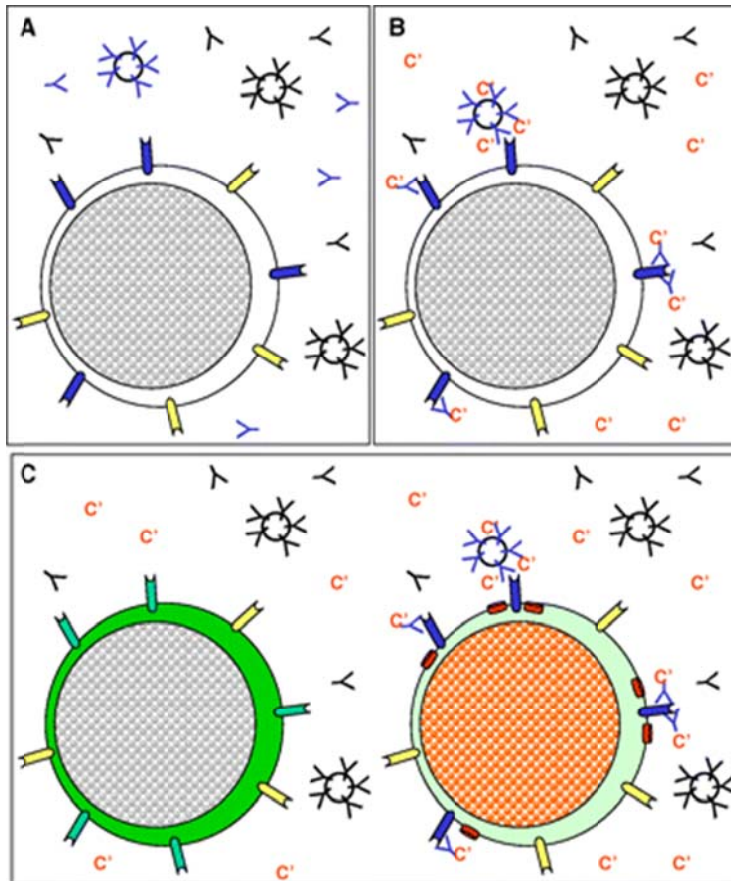
Τελευταία εφαρμόζεται η ανίχνευση ειδικών αντί-HLA αντισωμάτων (IgG, τάξης I και II) στον ορό των υπό μεταμόσχευση ασθενών με κυτταρομετρία ροής (flow PRA screening test).<sup>16</sup>

## Αναλυτικά

### **Γ.1.1. ΠΡΟΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (Pretransplant Antibody Screen)-CDC.**

Η ανίχνευση των αντισωμάτων περιέχει την εξέταση του ορού του ασθενή με τη χρήση ενός πάνελ των 30 ή περισσότερων κελιών. Ο στόχος της εξέτασης είναι να ανιχνεύσει τα αλλοαντισώματα και να καθορίσει την HLA ειδικότητά τους, έτσι ώστε οι δότες που φέρουν τα HLA αντιγόνα να αποκλειστούν εκ των προτέρων. Η εξέταση εκτελείται με την ανάλυση δεδομένων CDC και είναι προτιμότερο να γίνεται χρήση εξειδικευμένου λογισμικού. Ως πρότυπη τεχνολογία για την ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων του δότη έναντι στα HLA τάξης I ή / και τάξης II μόρια, η εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα λεμφοκυτταροτοξικότητας (CDC) δοκιμασία καθιερώθηκε στα τέλη του 1960 (εικ.34).<sup>17,18</sup>

Αυτή η δοκιμασία βασίζεται στην ανίχνευση των αλλοαντισωμάτων, τα οποία ασκώντας την επιβλαβή λειτουργία τους με το συμπλήρωμα και ενεργοποιώντας τα χαρακτηριστικά τους, τελικά οδηγούν στην λύση των κυττάρων του δότη. Ωστόσο, αυτή η τεχνική αποτυγχάνει να εντοπίσει εκείνα τα ειδικά αντισώματα του δότη, τα οποία στερούνται την ικανότητα περί καθορισμού του συμπληρώματος, αν και αυτά μπορεί να είναι επιζήμια, και για τα κύτταρα / όργανα του δωρητή. Λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της, η δοκιμασία CDC επίσης αποτυγχάνει να ανιχνεύσει χαμηλές συγκεντρώσεις αντισωμάτων οδηγώντας σε τροποποίησή της χρησιμοποιώντας δευτερογενή αντισώματα αντι-ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης [αντι-ανθρώπινη σφαιρίνη (AHG)-ενισχυμένη διασταύρωση CDC] για την αναγνώριση των πρωτογενών ειδικών αντισωμάτων του δότη. Ωστόσο, όλες οι παραλλαγές των προσδιορισμών CDC εξαρτώνται από την υψηλή ζωτικότητα των κυττάρων του δότη και είναι δύσκολα ερμηνεύσιμη με κύτταρα που εμφανίζουν ένα ποσοστό ζωτικότητας χαμηλότερο από 90%. Ως συνέπεια αυτών των μειονεκτημάτων της μεθόδου, παρήχθησαν νέες μέθοδοι ανεξάρτητες από την ποιότητα των κυττάρων, με αποτέλεσμα το σχεδιασμό της ανοσοδοκιμασίας στερεάς φάσεως (ELISA) για την ανίχνευση των αντι-HLA αντισωμάτων τάξης I και II.<sup>17,18</sup>



Πριν από την μεταμόσχευση, εκτελείται η CDC διαδικασία για να:

1. διευκρινιστεί το γενικό επίπεδο προ-ευαισθητοποίησης (antibody monitoring)
2. προσδιοριστούν τα πραγματικά ειδικά αντισώματα του δότη έναντι των HLA φαινοτύπων ενός δεδομένου δότη (crossmatching).

Η τιμή εκφράζεται ως ποσοστό των κυττάρων που αναγνωρίζονται από τον ορό του λήπτη. Είναι αυτονόητο ότι το επιλεγέν πάνελ των κυττάρων πρέπει να περιλαμβάνει τους HLA φαινοτύπους του δότη, καθώς και τον πληθυσμό του λήπτη.<sup>17,18,20</sup>

ί  
α  
οση  
τη-  
G και  
ος  
να  
αι  
του  
  
ιανο  
τη  
με  
ετική  
  
ίρων  
το  
ζιά)  
όσιμη  
ς  
  
ία  
  
tent/

## **Γ.1.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ-ELISA.**

Είναι μια ποιοτική, στερεάς φάσης ενζυματική ανοσοδεσμευτική μέθοδος (Elisa) για την ανίχνευση IgG αντισωμάτων κατά HLA αντιγόνων τάξης I.

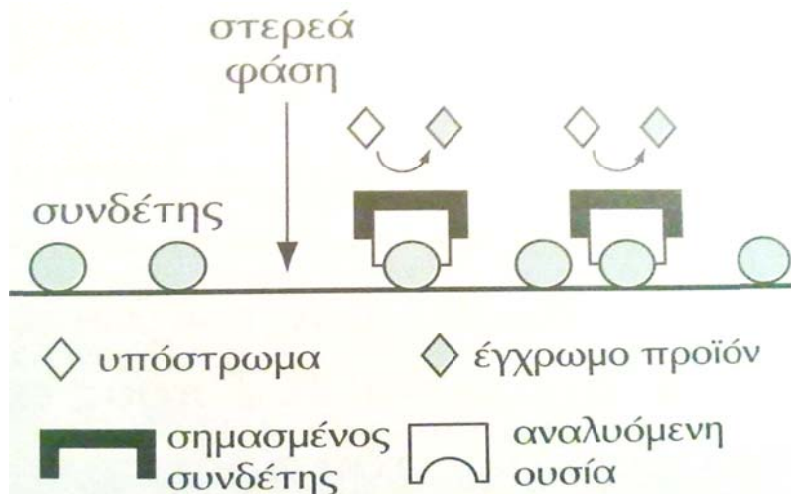
Τα HLA αντισώματα μπορούν να αποκτηθούν μέσω αλλοανοσοποίησης σαν αποτέλεσμα κύησης, μετάγγισης προϊόντων αίματος, ή και προηγούμενων μεταμοσχεύσεων. Εν γένει, η αλλοανοσοποίηση οδηγεί σε παραγωγή αντισωμάτων κατά HLA στο περίπου 30% των εκτιθέμενων ατόμων.

Τα σε υψηλό βαθμό πολυμορφικά ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα της τάξης I (HLA) βρίσκονται ευρέως διασκορπισμένα σε όλα τα εμπύρηννα κύτταρα. Τα αιμοπετάλια, παρότι δεν είναι εμπύρηννα, αποτελούν τμήματα εμπύρηννων μεγακαρυοκυττάρων και μεταφέρουν τα αντιγόνα της τάξης I.

Η στερεάς φάσης Elisa παρέχει υψηλώς κεκαθαρμένες γλυκοπρωτείνες HLA τάξης I, προερχόμενες από αιμοπετάλια αιμοδοτών. Οι κεκαθαρμένες γλυκοπρωτείνες είναι ακινητοποιημένες στα μικροβυθίσματα, δηλαδή σε βυθίσματα που βρίσκονται σε μικροπλάκες ή ταινίες. Η εξέταση αυτή προορίζεται για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά HLA αντιγόνων τάξης I (HLA-A-B-C).

### **Γ.1.2.1. Αρχικά**

Ο ορός ή το πλάσμα του ασθενούς προστίθεται στα μικροβυθίσματα επιστρωμένα με γλυκοπρωτείνες κεκαθαρμένες με χρωματογραφία υψηλής συγγένειας HLA τάξη I επιτρέποντας στο αντίσωμα, εάν υπάρχει, να δεσμευτεί (εικ.35). Έπειτα, τα μη δεσμευμένα αντισώματα εκπλένονται, προστίθεται αντιδραστήριο αλκαλικής φωσφατάσης σημασμένης με αντιανθρώπινη αιμοσφαιρίνη (κατά-IgG) στα βυθίσματα και ακολουθεί επώαση. Τα μη δεσμευμένα κατά-IgG εκπλένονται και προστίθεται το υπόστρωμα PNPP (p-νιτροφενυλική φωσφατάση). Μετά από περίοδο επώασης 30 λεπτών, η αντίδραση διακόπτεται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Τέλος, η οπτική πυκνότητα της αποκτώμενης χρώσης μετράται με φασματοφωτόμετρο.<sup>25</sup>



Κριτήρια αξιόπιστης εξέτασης :

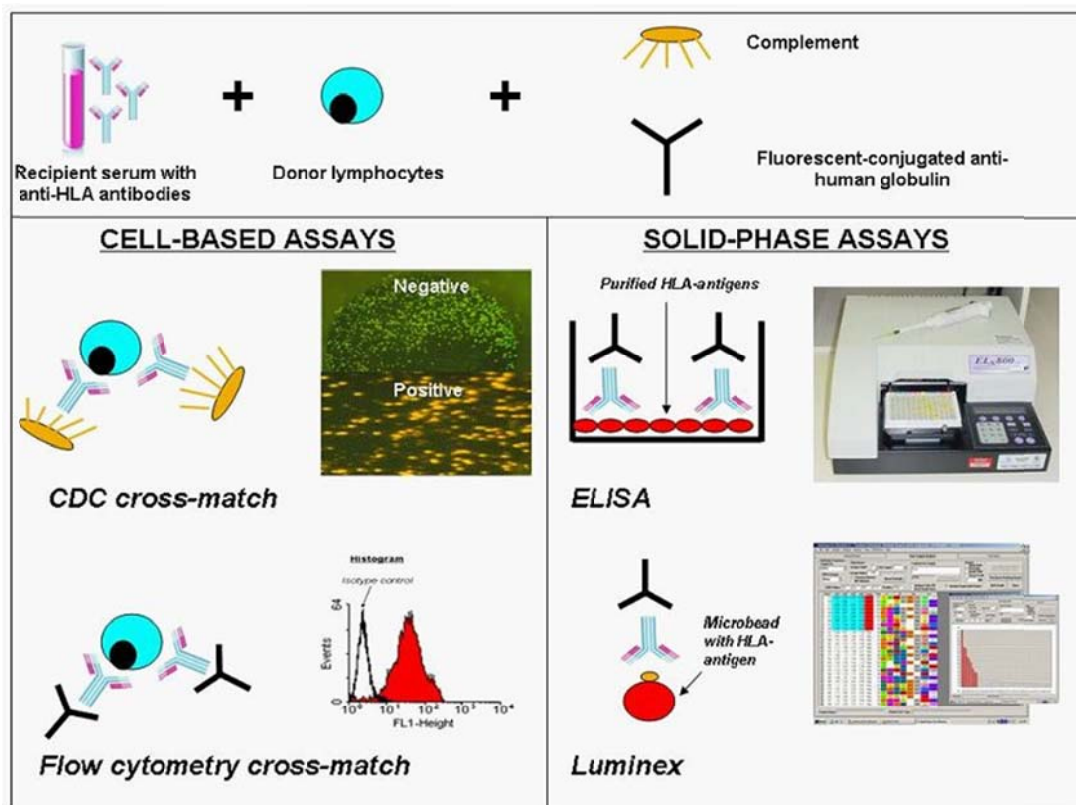
- Μέσος όρος αρνητικού ελέγχου- μέσος όρος OD (ΟΠ= Οπτική Πυκνότητα)= 0.040-0.150
- Μέσος όρος θετικού ελέγχου- μέσος όρος OD (ΟΠ= Οπτική Πυκνότητα)= > ή =1.500

Τα δείγματα, των οποίων τα αποτελέσματα βρίσκονται έξω από αυτό το όριο, πρέπει να επανεξετάζονται.<sup>25</sup>

### Γ.1.2.2. Περιορισμοί μεθόδου

1. Τα λανθασμένα αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από βακτηριακή μόλυνση των υλικών της εξέτασης, από ανεπαρκείς χρόνους επώασης, από ανεπαρκείς ή πλημμυλείς πλύσεις των υπό εξέταση βυθισμάτων, από έκθεση του υποστρώματος σε φως, από έκθεση σε υψηλότερες ή χαμηλότερες από τις συνιστώμενες θερμοκρασίες, ή από παράλειψη κάποιου σταδίου της διαδικασίας.
2. Η παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων ή συσσωματωμάτων ανοσοσφαιρίνης στο δείγμα του ασθενούς, ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένη μη-ειδική δέσμευση και να παράγει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα στην ανάλυση.

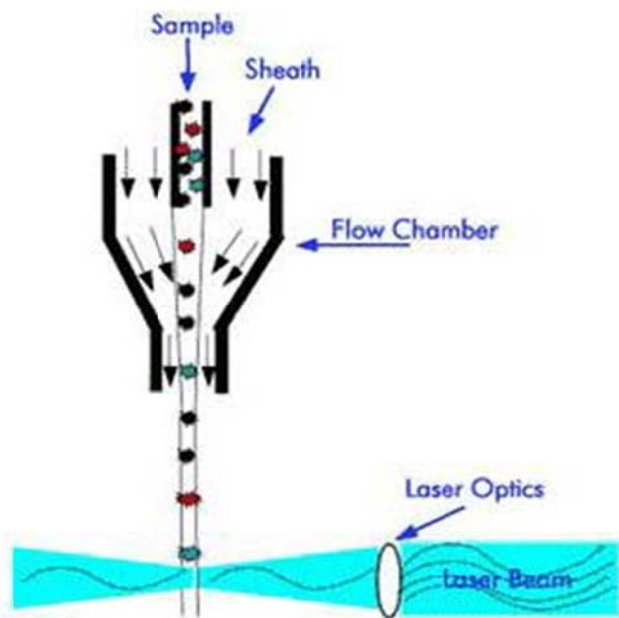
3. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως μόνη βάση μιας κλινικής διάγνωσης.
4. Κάποιοι χαμηλοί τίτλοι αντισωμάτων, δηλαδή χαμηλής ζωτικότητας αντισώματα, μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμα με την χρήση αυτής της ανάλυσης.
5. Τα HLA αντισώματα που δεν είναι λεμφοκυτταροτοξικά δεν θα ανιχνευθούν με αυτή τη μέθοδο.
6. Η μέθοδος αυτή δεν ανιχνεύει IgM, IgA ή HLA II αντισώματα.
7. Επίσης μερικά μη-κυτταροτοξικά HLA αντισώματα που δεν αντιδρούν στην λεμφοκυτταροτοξική ανάλυση (LCA) μπορεί να ανιχνευθούν με αυτή την τεχνική.<sup>25</sup>



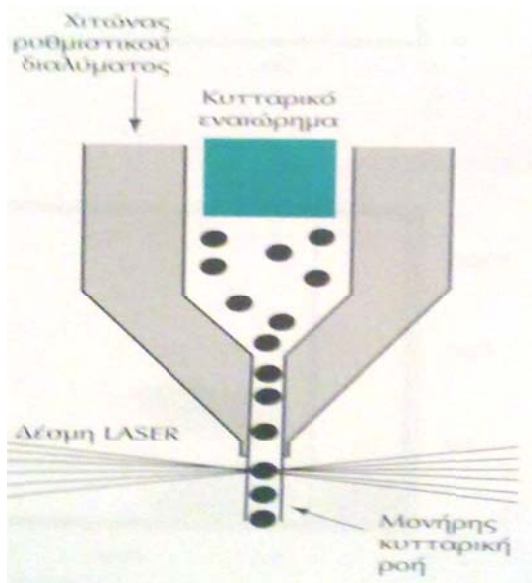
Cell-based assays	Solid-phase assays
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CDC-XM reduced the incidence of hyperacute rejection</li> <li>• Inability to identify the antigen causing positive</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitive with high degree of specificity to donor antigens, luminex more sensitive than ELISA</li> <li>• Capable of quantifying anti-HLA antibodies level</li> </ul>

### Γ.1.3. Η ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική για τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων σε ρέον υγρό. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονιάκής ανίχνευσης. Στις εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής μπορεί να περιλαμβάνεται και η ταξινόμηση των συστατικών βάσει φυσικών παραμέτρων. Είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό των κυτταρικών πληθυσμών του αίματος, καθώς επίσης και για τη διάγνωση και παρακολούθηση πολλών ασθενειών.<sup>26</sup>







Στην κυτταρομετρία ροής, το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά, κατά περίπτωση, μονοκλωνικά αντισώματα, συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης (δημιουργία ροής του υγρού περιβλήματος - sheath fluid), τα κύτταρα μεταφέρονται και διευθετούνται, με τέτοιο τρόπο ώστε να περνούν ένα-ένα από τη δέσμη του φωτός λέιζερ και στη συνέχεια έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοροχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο (εικ.37,38). Τέσσερα φωτεινά σήματα λαμβάνονται: α) το απ' ευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC εκ του Forward Scattering), το οποίο σχετίζεται με τον όγκο/μέγεθος του κυττάρου, β) το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC εκ του Sideward Scattering), το οποίο εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ. σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης), γ) ο παραγόμενος φθορισμός και δ) η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.<sup>26</sup>

Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών αναλογικής μορφής. Τα αναλογικά σήματα, μετατρέπονται σε ψηφιακά, διαμέσου ενός συστήματος μετατροπής αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (Analogue - to - Digital Conversion-ADC- system). Τα ψηφιακά σήματα καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι, μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο).<sup>26</sup>

#### **Γ.1.4. ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗΣ (PRA %).**

Στην δοκιμασία αυτή ελέγχεται ο ορός του λήπτη για την τυχόν παρουσία κυτταροτοξικών αντισωμάτων (Panel Reactive Antibodies % - PRA %). Ο ορός του λήπτη διασταυρώνεται με ένα σύνολο λεμφοκυττάρων από διάφορα άτομα (40-50). Από τον αριθμό των ατόμων των οποίων τα κύτταρα νεκρώθηκαν βγαίνει το ποσοστό PRA%. Τα αντι-HLA αντισώματα σχηματίζονται μετά από κύηση, μετάγγιση ή απόρριψη προηγούμενου μοσχεύματος. Συγκεκριμένα PRA > 70 % οδηγεί σε απόρριψη του μοσχεύματος.<sup>27</sup>

#### **Γ.2. Ειδικός έλεγχος (δοκιμασία διασταύρωσης)**

Οι δοκιμασίες ελέγχου συμβατότητας ή διασταύρωσης (crossmatching) είναι εξετάσεις αίματος, με τις οποίες ελέγχεται αν ο υποψήφιος λήπτης έχει επίκτητη ανοσία στους δωρηθέντες ιστούς, ενός συγκεκριμένου δότη. Οι δοκιμασίες αυτές εκτελούνται όποτε γίνεται νέα δωρεά οργάνου. Γίνεται έλεγχος δειγμάτων ορού από όλους τους υποψήφιους λήπτες με λεμφοκύτταρα του δότη. Η θετική δοκιμασία διασταύρωσης σημαίνει ότι ο λήπτης έχει μνήμη ή επίκτητη ανοσία, δηλαδή αντισώματα εναντίον των αντιγόνων του δότη και, επομένως, δεν μπορεί να λάβει το όργανο. Ο αριθμός των ευαισθητοποιημένων λεμφοκυττάρων, που αντιπροσωπεύουν την ανοσία που έχει αποκτήσει ο οργανισμός προς συγκεκριμένα αντιγόνα, παρουσιάζει αυξομειώσεις με το χρόνο.<sup>16</sup>

Μερικές φορές ο αριθμός αυτών των κυττάρων μπορεί να πέσει τόσο ώστε να μειωθεί σημαντικά το ποσοστό των δραστικών αντισωμάτων.<sup>16</sup>

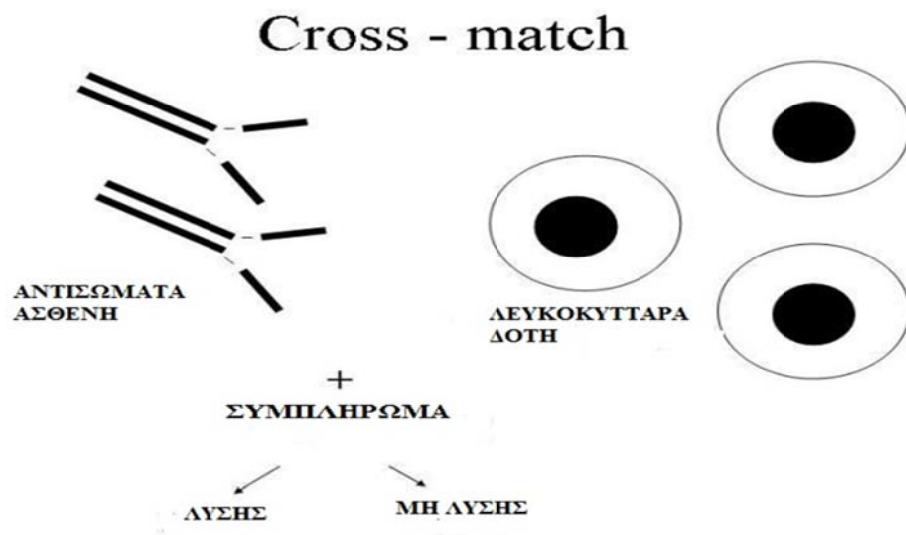
Λόγω αυτού του φαινομένου, είναι δυνατό η δοκιμασία διασταυρούμενης αντίδρασης με πρόσφατο ορό να είναι αρνητική, ενώ η ίδια δοκιμασία με παλαιότερο δείγμα ορού είναι θετική. Το αρνητικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας διασταύρωσης, στο τελευταίο δείγμα, μπορεί να υποδεικνύει ότι ο υποψήφιος λήπτης βρίσκεται σε περίοδο παραθύρου καλής συμβατότητας, καθώς θα εφαρμοστεί επιπλέον ανοσοκατασταλτική αγωγή, για την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της ανοσιακής απάντησης. Από τη άλλη μεριά, η ενεργοποίηση της ανοσιακής απάντησης, μετά από μετάγγιση αίματος που έγινε μετά τη λήψη του τελευταίου δείγματος πλάσματος, θα έχει ως συνέπεια να αποδειχθεί ψευδές το αρνητικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας διασταύρωσης. Η διακύμανση της κατάστασης ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος, καθιστά αναγκαίο το μηνιαίο έλεγχο δειγμάτων ορού των υποψήφιων ληπτών.<sup>16</sup>

### **Γ.2.1. Η δοκιμασία ιστικής διασταύρωσης (HLA crossmatch)**

Το HLA crossmatch (διασταύρωση) είναι ένα από τα σημαντικότερα τεστ που γίνονται πριν μία μεταμόσχευση οργάνου. Στην πραγματικότητα το crossmatch θεωρείται σαν ένα μικρό τεστ μεταμόσχευσης που γίνεται «έξω από το σώμα».<sup>16</sup>

Η εξέταση crossmatch μας δίνει πληροφορίες σχετικά με την πιθανότητα απόρριψης πριν το όργανο μεταμοσχευθεί στο σώμα του ασθενούς και καθορίζει εάν το σώμα του ασθενούς θα δεχτεί ή εάν έχει πιθανότητες να απορρίψει το μόσχευμα. Ένα θετικό crossmatch δείχνει ότι το ανοσολογικό σύστημα του ασθενούς έχει την ικανότητα να επιτεθεί και πιθανόν να απορρίψει το όργανο. Ένα «αρνητικό» crossmatch δείχνει ότι ο ασθενής δεν έχει αντισώματα στα HLA μόρια του δότη και επομένως υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η μεταμόσχευση οργάνου, να είναι επιτυχής. Επειδή λοιπόν, η έκβαση του crossmatch μπορεί να επιτρέπει ή να αποτρέπει τη μεταμόσχευση, για κάθε όργανο (ιδίως νεφρό) προς μεταμόσχευση υποβάλλονται ταυτόχρονα στο τεστ αυτό τουλάχιστον δύο ή τρεις υποψήφιοι λήπτες, ούτως ώστε να μη χαθεί πολύτιμος χρόνος για τη βιωσιμότητα του μοσχεύματος σε περίπτωση που ο πρώτος στη σειρά υποψήφιος κάνει θετικό crossmatch.<sup>16</sup>

Η δοκιμασία διασταύρωσης είναι μία απαραίτητη εργαστηριακή δοκιμασία πριν από την μεταμόσχευση. Στη μέθοδο αυτή ελέγχεται η παρουσία, στον ορό του λήπτη, αντί-HLA αντισωμάτων έναντι των τάξης I (T-διασταύρωση) ή και έναντι των τάξης II (B-διασταύρωση) HLA-αντιγόνων συγκεκριμένου δότη. Η προσθήκη συμπληρώματος προκαλεί λύση των κυττάρων του δότη, τα οποία έχουν συνδεθεί με τα αντίστοιχα αντί-HLA αντισώματα που πιθανός υπάρχουν στον ορό του λήπτη (εικ.39). Στην περίπτωση αυτή, η δοκιμασία θεωρείται θετική και η μεταμόσχευση δεν πραγματοποιείται. Επειδή το αποτέλεσμα της δοκιμασίας διασταύρωσης όμως επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, εφαρμόζεται τελευταία μία πιο ευαίσθητη κυτταρομετρική μέθοδος (flow cytometry crossmatch, FCXM). Επειδή το θετικό αποτέλεσμα της FCXM θεωρείται περισσότερο ως παράγοντας απόρριψης παρά ως αντένδειξη για μεταμόσχευση, η διεθνής πρακτική είναι να γίνεται η δοκιμασία διασταύρωσης πριν από την μεταμόσχευση με την κλασική CDC και αναδρομικά να χρησιμοποιείται η FCXM για την ρύθμιση της ανοσοκαταστολής. Ωστόσο σε ειδικές περιπτώσεις, όπως σε πολυευαισθητοποιημένους ασθενείς ή σε δεύτερη μεταμόσχευση, ή FCXM πρέπει να γίνεται παράλληλα με τη CDC-μέθοδο.<sup>16</sup>



## **Γ.2.2. FCXM**

Στη μεταμόσχευση του μυελού των οστών, τα προσηματοσιμένα κατά του δότη αντισώματα, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να είναι υπεύθυνα για την αποτυχία της μεταμόσχευσης. Αυτό βέβαια συμβαίνει σπάνια σε HLA ταυτόσημες μεταμοσχεύσεις, αλλά είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν υπάρχει αναντιστοιχία σε ένα ή περισσότερα HLA αντιγόνα. Η FCXM σε αυτές τις περιπτώσεις έχει το σαφές πλεονέκτημα της αυξημένης ευαισθησίας και μπορεί να θεωρηθεί ως η μέθοδος επιλογής για την ανίχνευση αυτών των αντισωμάτων πριν τη μεταμόσχευση.<sup>19</sup>

### **Γ.2.2.1. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα και πλεονεκτήματα**

- Ευκολία-γρήγορη και απλή μέθοδος.
- Ακρίβεια -δεν δίνονται ψευδώς θετικές αντιδράσεις που οφείλονται σε μη-HLA αντισώματα.
- Βολικότητα-δεν χρειάζεται ψύξη για τη διατήρηση των πάνελ και δεν υπάρχουν προβλήματα βιωσιμότητάς τους.
- Ευελιξία -λειτουργεί με τους περισσότερους κυτταρομετρητές ροής του εμπορίου.
- Περιεκτικότητα – πλήρες πάνελ-ισοδύναμο με τριάντα διαφορετικά λεμφοκύτταρα.
- Οικονομικά- ελάχιστα έξοδα αποστολής και αποθήκευσης.
- Περιεκτική ανάλυση-καθορίζει το τοις εκατό ποσοστό PRA για τα δείγματα ασθενών.<sup>19</sup>

## **Δ.ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΠΡΟΒΑΘΜΙΔΩΝ**

Τα προγονικά κύτταρα δεν αναγνωρίζονται μορφολογικά κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση των επιχρισμάτων του μυελού των οστών και γι' αυτό για τη μελέτη τους χρησιμοποιούνται πιο εξειδικευμένες μέθοδοι.<sup>37</sup>

## **Δ.1.ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ**

Για τον έλεγχο των κυτταρικών αντιγόνων γίνεται σήμανση των κυττάρων με ειδικά σεσημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία συνδέονται με τα αντίστοιχα αντιγόνα επιφανείας (CD), και ανιχνεύονται με ανοσοφθορισμό σε κυτταρόμετρα ροής.<sup>37</sup>

Κάθε ομάδα κυττάρων χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένους δείκτες (αντιγόνα) διαφοροποίησης. Συγκεκριμένα, τα αρχέγονα προγονικά κύτταρα φέρουν στη μεμβράνη τους τα αντιγόνα HLA-A,B,C και HLA-DR όπως και τα αντιγόνα CD34 και CD117.<sup>37</sup>

## **Δ.2.ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

### **Ημιστερεές Κυτταροκαλλιέργειες**

Οι καλλιέργειες αυτές γίνονται σε ημιστερεά καλλιεργητικά υλικά, στα οποία αναπτύσσονται οι αποικίες κυττάρων. Χαρακτηριστικό είναι ότι υπάρχει γραμμική συνάρτηση μεταξύ του αριθμού των προγονικών κυττάρων του δείγματος και του αριθμού των αποικιών (με παρουσία σταθερής ποσότητας αυξητικών παραγόντων). Η χρησιμότητα των καλλιεργειών αυτών είναι ιδιαίτερη σε περιπτώσεις αλλομεταμόσχευσης και αυτομεταμόσχευσης μυελού των οστών, για τον έλεγχο ύπαρξης ικανού αριθμού προγονικών κυττάρων στο δείγμα που πρόκειται να χορηγηθεί στο λήπτη.<sup>37</sup>

## **Δ.3.ΤΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ -CD34**

### **Εισαγωγή**

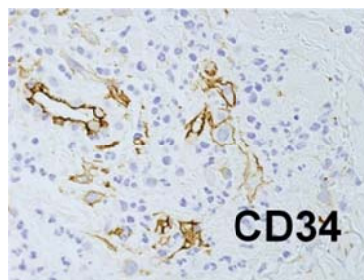
Τα Λεμφοκύτταρα εμφανίζουν στην επιφάνειά τους ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων που μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως διακριτοί δείκτες μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών. Αυτοί οι ειδικοί δείκτες καλούνται αντιγόνα (**αντιγόνα επιφανείας**) γιατί ανιχνεύονται με τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων.<sup>49,51,52</sup>

Ο επιφανειακός δείκτης που χαρακτηρίζει επακριβώς μια κυτταρική σειρά ή ένα στάδιο διαφοροποίησης, έχει καθοριστική δομή και αναγνωρίζεται από μια ομάδα – cluster-μονοκλωνικών αντισωμάτων, ονομάζεται μέλος ομάδας διαφοροποίησης, **Cluster of Differentiation**. Τα χαρακτηριστικά αυτά αντιγόνα ονομάζονται δείκτες επιφάνειας ή αντιγόνα διαφοροποίησης και αναφέρονται με τον όρο CD και ένα αριθμητικό προσδιορισμό όπως CD1,CD2 κλπ.<sup>49,51,52</sup>

## Ορισμός

Το CD34 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας, η οποία βρίσκεται σε ορισμένα κύτταρα μέσα στο ανθρώπινο σώμα, εκφράζεται όμως σε όλα σχεδόν τα αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα (εικ.40). Τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα είναι παρόντα στην επιφάνεια των πρώιμων αιμοποιητικών κυττάρων και αιμοποιητικών αποικιών που σχηματίζουν τα κύτταρα στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα.<sup>38</sup>

Η καταμέτρηση CD34 με κυτταρομετρία ροής παρέχει μια ταχεία και ακριβή αξιολόγηση της συχνότητας των θετικών προγονικών κυττάρων CD34 σε δείγματα από το μυελό των οστών, σε αίμα από ομφάλιο λώρο ή περιφερικό αίμα από ασθενείς οι οποίοι υπόκεινται σε θεραπεία με αιμοποιητικό αυξητικό παράγοντα. Η ικανότητα ποσοτικοποίησης κυττάρων CD34 είναι χρήσιμη στην αιμοποιητική μεταμόσχευση.<sup>49,51,52</sup>



### Δ.3.1.Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ CD34

Το CD34 εκφράζεται στους πρώιμους αιμοποιητικούς και αγγειακούς ιστούς. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για την ακριβή λειτουργία του. Αυτό που είναι γνωστό είναι ότι αποτελεί ένα σημαντικό μόριο προσκόλλησης και είναι απαραίτητο ώστε τα T κύτταρα να εισέλθουν στους λεμφαδένες. Ανεξάρτητα από τον τρόπο δράσης του, υπό όλες τις συνθήκες το CD34 έχει δειχθεί ότι διευκολύνει τη “μετανάστευση”

των κυττάρων. Ο προσδιορισμός του είναι σημαντικός για την χρονική στιγμή που πρέπει να εκτελεστεί η μεταμόσχευση του μυελού των οστών, καθώς επίσης αποτελεί καίρια παράμετρο και για την επιτυχή μεταμόσχευση.<sup>38</sup>

### **Δ.3.2.ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ CD34<sup>+</sup> ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ**

#### **Αρχή μεθόδου**

Τα θετικά προγονικά κύτταρα CD34 μπορούν να διακριθούν με βάση ιδιότητες σκέδασης φωτός σε συνδυασμό με αντιγόνα επιφάνειας. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι με διαφορετικά πρωτόκολλα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των CD34, οι οποίες όμως παρουσιάζουν μεγάλη συσχέτιση μεταξύ τους ως προς την ακρίβεια, την απλοϊκότητα και το κόστος.<sup>52</sup>

Οι χρήσεις της μέτρησης των CD34 είναι οι εξής:

- Ως προγνωστικός δείκτης στον προσδιορισμό του ιδανικού χρόνου εκτέλεσης της λευκαφαίρεσης.
- Στην εκτίμηση της απόδοσης της συλλογής και της πιθανότητας πραγματοποίησης συμπληρωματικών συλλογών.
- Στην εκτίμηση της ποιότητας του μοσχεύματος μετά την οποιαδήποτε επεξεργασία.
- Στον διαχωρισμό κυτταρικών πληθυσμών και τον καθαρισμό του μοσχεύματος.
- Στον καθορισμό της δόσης για έγχυση.
- Στην εκτίμηση της βιωσιμότητας σε συνδυασμό με φθοροχρωστική.
- Ως προγνωστικός δείκτης για την κινητική της εγκατάστασης του μοσχεύματος.
- Στον προσδιορισμό της επάρκειας του μοσχεύματος.
- Στον έλεγχο της αποκατάστασης της αιμοποίησης μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.<sup>38,39,40</sup>



Αποτελεί το πιο αξιόπιστο, και χρήσιμο εργαλείο για το σχεδιασμό της μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων.<sup>38,39</sup>

### **Δ.3.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ CD34<sup>+</sup> ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) παραμένουν ένα μυστήριο στη βιολογία, καθώς μπορούν να διαιρεθούν πλήρως σε θυγατρικά κύτταρα. Αυτό το μοναδικό χαρακτηριστικό προσδίδει στα κύτταρα αυτά την ικανότητα να ανασυστήσουν εντελώς τον αιμοποιητικό ιστό. Ως εκ τούτου, τα HSCs χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του ασθενούς κατά τη μεταμόσχευση μυελού των οστών. Μια επιτυχής μεταμόσχευση εξαρτάται από την έγχυση επαρκούς αριθμού αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, ώστε να επέλθει γρήγορα η αιματολογική ανάκαμψη. Ο αριθμός των CD34<sup>+</sup> κυττάρων στο περιφερικό αίμα χρησιμοποιείται ευρέως ως παράμετρος για τον χαρακτηρισμό της επαρκούς συγκέντρωσης αιμοποιητικών κυττάρων. Το επίπεδο των CD34<sup>+</sup> κυττάρων στο περιφερικό αίμα φθάνει στο μέγιστο σε διαφορετικούς χρόνους, ανάλογα με την αγωγή κινητοποίησης που χρησιμοποιείται. Είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ακριβώς πότε τα επίπεδα των CD34<sup>+</sup> κυττάρων είναι στο μέγιστο. Ο καθορισμός του απόλυτου αριθμού των CD34<sup>+</sup> κυττάρων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής είναι η μέθοδος αναφοράς που χρησιμοποιείται σήμερα, ωστόσο, αυτή η μέθοδος προσδιορισμού είναι αρκετά δαπανηρή και χρονοβόρα (μέσος χρόνος απόκρισης 1-2ώρες). Όπως είναι φυσικό έχουν αναπτυχθεί ποικίλες τεχνικές κυτταρομετρικής ανάλυσης σε διάφορα εργαστήρια, οπότε οι τιμές αναφοράς ποικίλουν και αυτό πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη.<sup>48,49</sup>

#### **Αξιολόγηση της απόδοσης των προγονικών κυττάρων**

Κατά την αξιολόγηση του αριθμού των προγονικών κυττάρων που συλλέγονται σε ασθενείς υπό αγωγή με αυξητικό παράγοντα θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού.<sup>48,51</sup>

Τα αποτελέσματα ανάλυσης κυτταρομετρικής ροής των CD34<sup>+</sup> κυττάρων ποικίλλουν ανάλογα με την ακριβή χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία και συνεπώς οι αριθμοί που συνιστώνται σύμφωνα με μελέτες άλλων εργαστηρίων θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.<sup>48,51</sup>

Η στατιστική ανάλυση της σχέσης μεταξύ του αριθμού των CD34<sup>+</sup> κυττάρων που έχουν επανεγγυθεί και του ρυθμού επαναφοράς των αιμοπεταλίων στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από χημειοθεραπεία υψηλών δόσεων δηλώνει μία περίπλοκη αλλά συνεχή σχέση.<sup>48,51</sup>

Η σύσταση για ελάχιστη απόδοση των 2,0 x10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup> κυττάρων/kg βασίζεται σε εμπειρία που αναφέρεται στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία και έχει ως αποτέλεσμα την επαρκή αιματολογική αποκατάσταση. Αποδόσεις μεγαλύτερες από αυτή φαίνεται ότι σχετίζονται με ταχύτερη ανάνηψη, ενώ μικρότερες με βραδύτερη ανάνηψη.<sup>48,51</sup>

## **ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΕΠΙΤΕΥΞΕΙΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

### **A. Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών χωρίς απόλυτη συμβατότητα.**

Νέα πρωτοποριακή τεχνική μεταμόσχευσης μυελού κατάφεραν να πραγματοποιήσουν οι γιατροί του νοσοκομείου Great Ormond Street του Λονδίνου, ενώ θεωρούν ότι η νέα αυτή μέθοδος θα μειώσει το πρόβλημα με την έλλειψη συμβατών δοτών για μεταμοσχεύσεις καθώς δεν απαιτεί απόλυτη συμβατότητα.<sup>28</sup>

Η νέα επαναστατική θεραπευτική μέθοδος δοκιμάστηκε στον 5χρονο Mohamed Ahmedo οποίος υπέφερε από σοβαρό σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας και ήταν σε λίστα αναμονής για χρόνια.<sup>28</sup>

Τότε οι γιατροί αποφάσισαν ότι έπρεπε να μεταμοσχευτεί άμεσα ακόμα και από έναν μη απόλυτα συμβατό δότη και επέλεξαν τον πατέρα του, Jamil, για να γίνει δότης.<sup>28</sup>

Πριν πάρουν τον μυελό από τον Jamil του έκαναν το εμβόλιο για τη γρίπη των χοίρων ώστε τα δικά του κύτταρα να γνωρίζουν πώς να πολεμήσουν τον ιό. Οι γιατροί μετά στο εργαστήριο τροποποίησαν τα ανοσοποιητικά T λεμφοκύτταρα, και

δημιούργησαν ένα δίχτυ ασφαλείας, που ήταν ένα αυτοκαταστροφικό μήνυμα που θα μπορούσε να τεθεί σε λειτουργία αν το σώμα του μικρού Mohamed ξεκινούσε να τα απορρίψει μετά τη μεταμόσχευση. Η μεταμόσχευση, που έγινε το 2011, στέφθηκε με επιτυχία και δεν χρειάστηκε οι γιατροί να χρησιμοποιήσουν το δίχτυ ασφαλείας. Ο πατέρας του μάλιστα δήλωσε ότι ο γιος του είναι αρκετά καλά, τόσο που μερικές φορές ξεχνάνε τι πέρασε.<sup>28</sup>

Η Δρ. Waseem Qasim, σύμβουλος στην παιδιατρική ανοσολογία στο Νοσοκομείο Great Ormond Street και πρώτη συγγραφέας της μελέτης δήλωσε ότι αυτή η νέα προσέγγιση θα μπορούσε να σημαίνει ότι τα παιδιά που μεταμοσχεύονται από μη συμβατό δότη θα μπορούσαν να έχουν τις ίδιες πιθανότητες επιτυχίας με όσα μεταμοσχεύονται από κάποιον απόλυτα συμβατό.<sup>28</sup>

Αυτή τη στιγμή 37000 άνθρωποι παγκοσμίως περιμένουν για μεταμόσχευση μυελού των οστών και ότι γενικά μόνο το 30% των ανθρώπων θα βρουν συμβατό δότη μέσα από την οικογένειά τους.<sup>28</sup>

## **B. Αντικατάσταση ανοσοποιητικού συστήματος του λήπτη μοσχεύματος μέσω Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών.**

Αμερικανοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι βρήκαν τρόπο να απαλλάξουν τους λήπτες μοσχευμάτων από δύο βασικά προβλήματα: την ανάγκη εύρεσης απολύτως συμβατού δότη, αλλά και την ανάγκη λήψης ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων εφόρου ζωής, τα οποία χρειάζονται σήμερα για να αποφύγουν την απόρριψη του μοσχεύματος.<sup>29</sup>

Η νέα τεχνική, η οποία παρουσιάζεται στην επιθεώρηση Science Translational Medicine, αφορά ουσιαστικά την αντικατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του λήπτη με το ανοσοποιητικό σύστημα του δότη.<sup>29</sup>

Αυτό γίνεται μέσω της μεταμόσχευσης μυελού των οστών, από τον οποίο προέρχονται τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.<sup>29</sup>

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε μόλις οκτώ ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση νεφρού. Σε κάποιους από αυτούς, μάλιστα, τα μοσχεύματα νεφρού

και μυελού των οστών δεν παρουσίαζαν πλήρη ιστοσυμβατότητα.<sup>29</sup>

Οι πέντε από τους οκτώ ασθενείς έπαψαν τελικά να λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, και οι ερευνητές ευελπιστούν τώρα ότι η μέθοδος θα είναι εξίσου αποτελεσματική και στις μεταμοσχεύσεις άλλων οργάνων.<sup>29</sup>

## **Γ. Η Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών ως θεραπεία στη νόσο του AIDS.**

Αν και θεωρείται πρόωρο να μιλήσει κανείς για θεραπεία, οι γιατροί αισιοδοξούν ότι η νέα μέθοδος ίσως ανοίγει το δρόμο, ώστε όχι μόνο η μόλυνση από τον ιό να τεθεί υπό έλεγχο, αλλά και να καταπολεμηθεί πλήρως στο μέλλον.<sup>30</sup>

Οι δύο ανώνυμοι άνδρες, γνωστοί και ως «ασθενείς της Βοστώνης», έκαναν την μεταμόσχευση στο Κέντρο Καρκίνου Dana Farber/Brigham της αμερικανικής πόλης, σύμφωνα με τους «Τάιμς της Νέας Υόρκης» και το «New Scientist». Η ενθαρρυντική ανακοίνωση για την περίπτωση τους έγινε σε διεθνές ιατρικό συνέδριο για το AIDS στην Κουάλα Λουμπούρ της Μαλαισίας.<sup>30</sup>

Οι ασθενείς έπασχαν από καρκίνο του αίματος και γι' αυτό έκαναν τη μεταμόσχευση. Όταν όμως τα κύτταρά τους αντικαταστάθηκαν από το κύτταρα του δωρητή του μυελού των οστών, τα επίπεδα του ιού HIV στο αίμα τους σταθερά μειώθηκαν, ώσπου έπεσαν σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο.<sup>30</sup>

Έτσι, οι δύο άνδρες σταμάτησαν την φαρμακευτική θεραπεία για το AIDS. Και οι δύο συνεχίζουν, μετά τη διακοπή της αγωγής, να μην εμφανίζουν τον ιό HIV στο αίμα τους και ζουν μια φυσιολογική ζωή.<sup>30</sup>

«Αν και τα αποτελέσματα των εξετάσεών τους είναι εντυπωσιακά, δεν δείχνουν ακόμα πως οι ασθενείς έχουν θεραπευτεί. Θα χρειαστεί η μακρόχρονη παρακολούθησή τους για ένα χρόνο τουλάχιστον, προκειμένου να κατανοηθεί η πλήρης επίπτωση της μεταμόσχευσης του μυελού των οστών στον ιό HIV», δήλωσε ο επικεφαλής της έρευνας Τίμοθι Χένριχ.<sup>30</sup>

Οι επιστήμονες εξετάζουν να εντοπίσουν τον ιό όχι μόνο στο αίμα των δύο ανδρών

αλλά και σε άλλους ιστούς, χωρίς να έχουν βρει -προς το παρόν τουλάχιστον- το παραμικρό ίχνος του. Όμως ο HIV ίσως κρύβεται κάπου στον οργανισμό, ικανός να ενεργοποιηθεί ξανά στο μέλλον, πιθανώς σε μερικούς μήνες. Συνήθως όταν ο ασθενής σταματά τα φάρμακα, ο ιός επανεμφανίζεται σε ένα μήνα περίπου, αν και κάθε περίπτωση είναι διαφορετική.<sup>30</sup>

Είχε προηγηθεί η παρόμοια περίπτωση του λεγόμενου «ασθενούς του Βερολίνου», του αμερικανού Τίμοθι Ρέι Μπράουν, ο οποίος, επίσης επειδή είχε καρκίνο του αίματος, έκανε μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων μυελού των οστών από ένα δότη. Ο δότης αυτός -λόγω της λεγόμενης «μετάλλαξης δέλτα 32» σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη (CCR5) του- είχε μια πολύ σπάνια εκ γενετής αντίσταση στον ιό HIV.<sup>30</sup>

Πέντε χρόνια μετά την επέμβαση, ο Μπράουν φαίνεται να έχει θεραπευτεί τόσο από τον καρκίνο, όσο και από το AIDS, γι' αυτό θεωρείται η πρώτη περίπτωση θεραπείας από τη νόσο.<sup>30</sup>

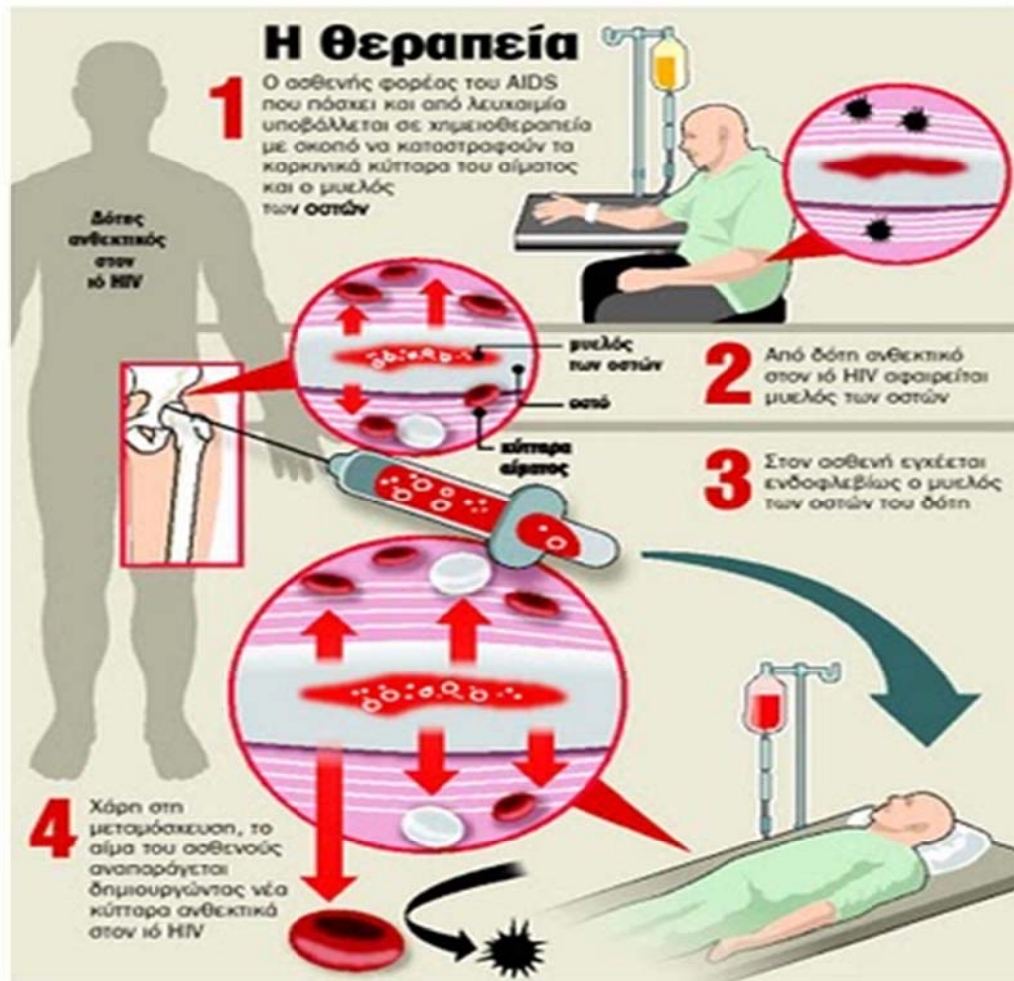
Όμως η θεραπευτική επέμβασή του είχε μεγάλους κινδύνους και ήταν πανάκριβη, ενώ είναι πολύ δύσκολο να βρεθούν δότες κυττάρων με γενετική αντίσταση στον ιό HIV.<sup>30</sup>

Προσφατα πάντως έχουν αναφερθεί και άλλες περιπτώσεις θεραπείας από AIDS, όπως ενός μικρού παιδιού στο Μισισιπή και μιας ομάδας 14 ενηλίκων, οι οποίες έχουν αποδοθεί στην πολύ έγκαιρη χορήγηση των φαρμάκων μετά την αρχική διάγνωση.<sup>30</sup>

Η βραβευμένη με το Νόμπελ ιατρικής (2008) ιολόγος Φρανσουάζ Μπαρ-Σινουσί του Ινστιτούτου Παστέρ του Παρισιού, η οποία συνέβαλε στην ανακάλυψη του ιού που προκαλεί τη νόσο του AIDS και σήμερα είναι πρόεδρος της Διεθνούς Εταιρίας AIDS, δήλωσε σχετικά με τους δύο «ασθενείς του Βερολίνου»: «Το αποτέλεσμα είναι πολύ ενθαρρυντικό, αλλά θα πρέπει να περάσει περισσότερος χρόνος. Πρέπει να κατανοηθεί καλύτερα γιατί αυτοί οι ασθενείς δεν έχουν πια ανιχνεύσιμο ιό. Όλοι οι μηχανισμοί πρέπει να γίνουν κατανοητοί ώστε να υπάρξει η ελπίδα για ανάπτυξη μιας μελλοντικής εναλλακτικής στρατηγικής για άλλους ασθενείς, χωρίς κατ' ανάγκη να χρειάζεται να υποβληθούν σε μεταμόσχευση».<sup>30</sup>

Περίπου 34 εκατ. άνθρωποι σε όλο τον κόσμο εκτιμάται ότι έχουν AIDS, οι

περισσότεροι σε φτωχές χώρες, για τους οποίους οι ακριβές θεραπείες πολύ μικρή χρησιμότητα μπορεί να έχουν.<sup>30</sup>



#### **Δ. Πρωτοποριακές εξελίξεις στη μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων.**

Διευρύνεται ο πληθυσμός των ασθενών που μπορούν να υποβληθούν σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSCT – hematopoietic stem cell transplantation) κατόπιν των ιδιαίτερα σημαντικών εξελίξεων στις στρατηγικές και τις τεχνολογίες των μεταμοσχεύσεων, οι οποίες ανακοινώθηκαν στα πλαίσια της 55ης Ετήσιας Συνάντησης της Αμερικανικής Αιματολογικής Εταιρείας στη Νέα Ορλεάνη.<sup>31</sup>

Μέχρι πρότινος, οι ασθενείς με δύσκολα θεραπεύσιμες μορφές καρκίνου του αίματος- λευχαιμίες, όφειλαν να ακολουθήσουν την αποτελεσματική αλλά ριψοκίνδυνη εναλλακτική αντιμετώπιση του καρκίνου του αίματος αντί της φαρμακευτικής αγωγής, που αφορούσε θεραπεία «αντικατάστασης» του μυελού των οστών με υγιή κύτταρα είτε από τον ίδιο τον ασθενή (αυτόλογη μεταμόσχευση) είτε από δότες (αλλογενής μεταμόσχευση).<sup>31</sup>

Έτσι, δινόταν η δυνατότητα στον ασθενή να παλέψει μόνος του την πάθηση. Οι γιατροί αναζητούσαν κύτταρα από δότη που θα ήταν απόλυτα συμβατά με τον κυτταρικό τύπο του ασθενούς, καθώς η συγκεκριμένη προσέγγιση θεωρούνταν η βέλτιστη, που θα διασφάλιζε θετικά αποτελέσματα και θα ελαχιστοποιούσε τον κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου μοσχεύματος κατά του ξενιστή (graft-versus-host disease ή GVHD), μια σοβαρή και επικίνδυνη για τη ζωή επιπλοκή που εκδηλώνεται όταν τα ξένα κύτταρα του δότη επιτίθενται στα κύτταρα του ασθενούς, επειδή τα αναγνωρίζουν ως ξένο ιστό.<sup>31</sup>

Τα ευρήματα των νέων μελετών όμως υποδεικνύουν ότι με σωστή διερεύνηση, τα μοσχεύματα με απλοσυμβατό τύπο ιστοσυμβατότητας (50% ιστοσυμβατά) ή τα μοσχεύματα με κύτταρα ομφαλοπλακουντιακού αίματος μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως βιώσιμες, αποτελεσματικές εναλλακτικές λύσεις, όταν δεν μπορεί να βρεθεί απόλυτα συμβατός δότης, θέτοντας υπό αμφισβήτηση τις παραδοσιακές αντιλήψεις ως προς την επιλεξιμότητα των μοσχευμάτων και τη διασταύρωση με τον δότη, σε μια προσπάθεια βελτίωσης των μακροπρόθεσμων επιπέδων επιτυχίας και διεύρυνσης του πληθυσμού των ασθενών που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τη θεραπεία αυτή.<sup>31</sup>

Οι ερευνητές υποστηρίζουν επίσης ότι τα αποτελέσματα των μεταμοσχεύσεων μπορεί να βελτιωθούν ακόμα περισσότερο αν αναγνωρισθούν οι ασθενείς που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης συγκεκριμένων επιπλοκών, όπως μείωση των νοητικών λειτουργιών, ή αν εφαρμόζονται μετά τις μεταμοσχεύσεις, θεραπείες για τον περιορισμό του κίνδυνου υποτροπής.<sup>31</sup>

Σύμφωνα με τον γιατρό, συντονιστή της συνέντευξης τύπου και Αναπληρωτή Διευθυντή του Μασονικού Καρκινικού Κέντρου, Τζέφρη Μίλερ, τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν ήταν συναρπαστικά και φανερώνουν ότι οι μεταμοσχεύσεις

αποτελούν επιλογή αποτελεσματικής θεραπείας σε ολοένα και περισσότερους ασθενείς με καρκίνο του αίματος- λευχαιμίες.<sup>31</sup>

«Για πολλά χρόνια, η μεταμόσχευση δεν ήταν εφικτή για πολλούς ασθενείς οι οποίοι δεν διέθεταν αδέρφια ή σε περιπτώσεις που δεν ήταν δυνατόν να βρεθεί απόλυτα συμβατός δότης. Σήμερα όμως, αυτοί οι ασθενείς έχουν τη δυνατότητα να επωφεληθούν από τις νέες στρατηγικές και να προχωρήσουν σε επιτυχή μεταμόσχευση. Σήμερα, είναι δυνατό να γίνουν προσπάθειες στη βελτίωση της συνολικής εμπειρίας του ασθενούς και να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος υποτροπής, η κύρια αιτία θανάτου μετά από μεταμόσχευση. Ως εκ τούτου, έχουν βελτιωθεί σημαντικά τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα και το προσδόκιμο ζωής ασθενών που μέχρι τώρα δεν διέθεταν άλλη επιλογή θεραπείας».<sup>31</sup>

Αναλύοντας τις νέες εξελίξεις, η καθηγήτρια Ιστολογίας Εμβρυολογίας ΑΠΘ κα. Κοκκώνα Κουζή Κολιάκου, εξηγεί ότι η σπανιότητα των μοσχευμάτων και το σύνδρομο του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (GVHD), λόγω μη απόλυτης ιστοσυμβατότητας, αποτελεί πάντα ένα σοβαρό πρόβλημα.<sup>31</sup>

Παρά την επιβεβαιωμένη εργαστηριακά ιστοσυμβατότητα μεταξύ δότη και ασθενούς συχνά οι ασθενείς παρουσιάζουν την οξεία ή χρόνια μορφή του συνδρόμου, επειδή η εργαστηριακή διερεύνηση της ιστοσυμβατότητας δεν καλύπτει το σύνολο των γονιδίων που εμπλέκονται στο σύστημα της ιστοσυμβατότητας.<sup>31</sup>

Λόγω του ότι η ιστοσυμβατότητα μεταβιβάζεται κληρονομικά, ο καλύτερος δότης κλασικά μέχρι σήμερα θεωρείτο ο αδελφός. Το καλύτερο βέβαια μόσχευμα παραμένει το αυτόλογο, αυτό που προέρχεται από τον ίδιο τον ασθενή, επειδή δεν διατρέχει τον κίνδυνο της απόρριψης. Στις περιπτώσεις που ο ασθενής νοσεί από λευχαιμία απαγορεύεται να διαθέσει το δικό του μόσχευμα, επειδή ο μυελός των οστών του είναι διηθημένος από τα καρκινικά κύτταρα. Είναι δυνατό όμως να χρησιμοποιήσει το δικό του μόσχευμα στις περιπτώσεις εκείνες, όπου ενώ είναι υγιής έχει κρυσυντηρήσει τα δικά του αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα.<sup>31</sup>

Οι νέες αυτές ανακοινώσεις δείχνουν ότι το πρόβλημα της ιστοσυμβατότητας θα μπορέσει στο μέλλον να ξεπεραστεί με την κατάλληλη επιλογή των μοσχευμάτων, όπου πλέον δεν θα απαιτείται απόλυτη ιστοσυμβατότητα αλλά απλοσυμβατότητα η οποία αναφέρεται στην απλή σειρά των γονιδίων, δηλαδή 50% ιστοσυμβατότητα,



κάτι που ήταν απαγορευτικό τα προηγούμενα χρόνια, ιδίως για τον μυελό των οστών.<sup>31</sup>

Το ομφαλοπλακουντιακό αίμα αποδεικνύεται μια πολύ σημαντική εναλλακτική λύση στις μεταμοσχεύσεις, δεδομένου ότι λόγω της νεαρής ηλικίας των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων που περιέχει δεν απαιτείται απόλυτη ιστοσυμβατότητα και εθεωρείτο σήμερα ιδανικό μόσχευμα για τα αδέρφια.<sup>31</sup>

Αν ληφθεί υπόψη η σημερινή πρόοδος και η δυνατότητα επιλογής των μοσχευμάτων, τότε το ομφαλοπλακουντιακό αίμα θα αποτελεί ιδανικό μόσχευμα και για τους γονείς στις περιπτώσεις της λευχαιμίας, οι οποίοι θα μπορούν να χρησιμοποιούν τα βλαστοκύτταρα των παιδιών τους με χαμηλότερη ιστοσυμβατότητα και χωρίς κίνδυνο απόρριψης.<sup>31</sup>

Είναι γνωστό ότι τα παιδιά κληρονομούν από κάθε γονέα τον απλότυπο και επομένως με βάση τη σημερινή εξέλιξη θα μπορούν αυτά να δίνουν τα βλαστοκύτταρα του ομφαλοπλακουντιακού αίματος στους γονείς τους για τη θεραπεία κακοηθειών. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που ανακοινώθηκαν το 2010, σε παγκόσμια κλίμακα η οικογένεια προσέφερε το 86% των μοσχευμάτων και αυτό σήμερα εξηγείται με βάση τον απλότυπο που οι γονείς κληρονομούν στα παιδιά τους.<sup>31</sup>

Σύμφωνα με την κα. Κ. Κουζή Κολιάκου, η εύκολη πρόσβαση στη συλλογή των βλαστοκυττάρων του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, τα πλεονεκτήματα τους και η δυνατότητα δημιουργίας τραπεζών βλαστοκυττάρων γνωστής ιστοσυμβατότητας, ανοίγει το δρόμο στην οικογένεια αλλά και σε πολλούς ασθενείς με σπάνιο τύπο ιστοσυμβατότητας ώστε να μπορέσουν να βρουν το κατάλληλο μόσχευμα που θα τους βοηθήσει να ξεπεράσουν το πρόβλημα της κακοήθειας που αντιμετωπίζουν. Οι παραπάνω εξελίξεις στις μεταμοσχεύσεις του μυελού των οστών, αλλά και γενικότερα των μεταμοσχεύσεων, με τη δυνατότητα της κατάλληλης επιλογής των μοσχευμάτων, τη χρήση του απλοτυπικού τύπου της ιστοσυμβατότητας και τη μείωση της απόρριψης, θα αυξήσει τον αριθμό των ασθενών που θα μπορούν να βρουν ένα κατάλληλο μόσχευμα και θα βελτιώσει την ποιότητα ζωής. Η οικογένεια θα έχει περισσότερες ευκαιρίες να προσφέρει στα μέλη της υψηλής ποιότητας ιστοσυμβατά αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα με λιγότερες μεταμοσχευτικές επιπλοκές, καταλήγει η κα. Κ. Κουζή Κολιάκου.<sup>31</sup>

## Περίληψη

Ένα από τα μεγαλύτερα επιτεύγματα στο χώρο της ιατρικής του 20ου αιώνα αποτελούν και οι μεταμοσχεύσεις. Η επινόηση και η εφαρμογή των μεταμοσχεύσεων έσωσε και εξακολουθεί να σώζει τη ζωή χιλιάδων ανθρώπων ανά τον κόσμο, διότι χάρη σε αυτές, δόθηκε η δυνατότητα αντικατάστασης ζωτικών οργάνων αλλά και ιστών για τον άνθρωπο. Έτσι υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο μυελός των οστών είτε ανεπαρκεί, ή έχει καταστραφεί ή διηθηθεί από κακοήθη κύτταρα, εκδηλώνοντας σοβαρότατα αιματολογικά νοσήματα, όπως λευχαιμία, μυελική απλασία κ.α. Συγκεκριμένα ένας μεγάλος αριθμός συνανθρώπων μας, μεταξύ των οποίων πολλά παιδιά, πεθαίνουν από αυτά τα σοβαρά αιματολογικά νοσήματα γιατί ο μυελός τους, δηλαδή το «εργοστάσιο» που φτιάχνει τα κύτταρα του αίματός, παρουσιάζει σοβαρή βλάβη. Η αντιμετώπιση των νοσημάτων αυτών επιχειρείται με διάφορα φαρμακευτικά σχήματα, αλλά πολλές φορές η μόνη θεραπεία είναι η μεταμόσχευση μυελού των οστών. Επίσης η μεταμόσχευση μυελού των οστών χρησιμοποιείται για την αντικατάσταση των κυττάρων του μυελού των οστών που έχει καταστραφεί από την ακτινοβολία ή τη χημειοθεραπεία. Η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση μυελού οστών έγινε το 1968 ενώ σήμερα γίνονται σχεδόν 50.000 μεταμοσχεύσεις κάθε χρόνο. Η μεταμόσχευση μυελού των οστών περιλαμβάνει τη λήψη υγιών βλαστικών κυττάρων από το μυελό των οστών ενός ατόμου και τη μεταφορά τους στο μυελό των οστών του ασθενή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ασθενής είναι δυνατόν να λάβει το μυελό των οστών από το δικό του σώμα. Αυτή η μέθοδος είναι γνωστή ως αυτόλογη μεταμόσχευση. Πριν επιστραφεί, όμως, ο μυελός των οστών στον ασθενή πρέπει να απαλειφθεί από τυχόν κατεστραμμένα ή ασθενικά κύτταρα. Εκτός από αυτή τη μέθοδο πολλές φορές η θεραπεία βασίζεται στην αντικατάσταση του μυελού των οστών του ασθενή από κύτταρα του μυελού των οστών ενός υγιή δότη. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών.

Προκειμένου, βέβαια, η μεταμόσχευση να έχει επιτυχία είναι απολύτως απαραίτητο ο δότης και ο λήπτης να παρουσιάζουν ιστική συμβατότητα, δηλαδή ομοιότητα ως προς ειδικά μόρια (αντιγόνα του συστήματος HLA) που εκφράζονται πάνω στα κύτταρά τους. Τα HLA αντιγόνα, τα οποία είναι διαφορετικά σε κάθε άτομο και καθορίζουν την «Ιστική Ταυτότητά» του, προσδιορίζονται σε ειδικά εργαστήρια ιστοσυμβατότητας σε δείγμα αίματος και η σύγκριση της «Ιστικής Ταυτότητας» δύο ατόμων έχει σαν αποτέλεσμα την εκτίμηση της ομοιότητας-συμβατότητας μεταξύ τους. Ωστόσο στην μεταμόσχευση του μυελού των οστών το πρόβλημα δεν είναι τόσο η απόρριψη του μοσχεύματος όσο η ανοσιακή προσβολή των κυττάρων του λήπτη από τα ανοσοδραστικά κύτταρα που περιέχονται στο μόσχευμα, η οποία είναι γνωστή ως *αντίδραση του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή* ή GVHD και διακρίνεται σε οξεία και χρόνια ανάλογα με την νέκρωση των οργάνων που προκαλεί.

Για αυτό το λόγο ο προμεταμοσχευτικός ανοσολογικός έλεγχος είναι ουσιαστικής σημασίας για την καλή έκβαση της μεταμόσχευσης και περιλαμβάνει:

- Τον προσδιορισμό των HLA αντιγόνων
- Την ανίχνευση των αντι-HLA (κυτταροτοξικών) αντισωμάτων
- Τη μικτή καλλιέργεια λεμφοκυττάρων (MLC), χρησιμοποιείται μόνο στις μεταμοσχεύσεις από ζωντανό δότη λόγω της μεγάλης χρονικής διάρκειας. Με αυτή την μέθοδο εκτιμάται η *in vitro* απάντηση των κυττάρων του λήπτη στις ασυμβατότητες των HLA DR, DQ γονιδίων. Η μικτή καλλιέργεια έχει σήμερα αντικατασταθεί από μοριακές τεχνικές και δεν χρησιμοποιείται πλέον από τα περισσότερα εργαστήρια.

Για τον προσδιορισμό των HLA αντιγόνων τάξης I και τάξης II χρησιμοποιούνται ορολογικές μέθοδοι με τη χρήση πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντι-HLA αντιωρών. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος είναι μικρολεμφοκυτταροτοξική δοκιμασία (microlymphocytotoxic test) ή η εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (complement dependent cytotoxicity, CDC), η οποία στηρίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος σε πλάκες Terasaki, παρουσία συμπληρώματος κουνελιού. Ωστόσο η εφαρμογή μοριακών μεθόδων έλυσε τα προβλήματα προσδιορισμού των τάξης II κυρίως αντιγόνων χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR ( PCR-SSP, -SSO) και των RFLPs. Αυτές οι μέθοδοι είναι ταχείες

και επιτρέπουν τον προσδιορισμό όχι μόνο των ειδικοτήτων αλλά και των σχισμών και των υποτύπων τους.

Όσον αφορά την ανίχνευση των αντι-HLA αντισωμάτων εφαρμόζεται ουσιαστικά ο έλεγχος ευαισθητοποίησης των υπό μεταμόσχευση υποψηφίων ληπτών και διακρίνεται σε γενικό και ειδικό έλεγχο. Στον γενικό ελέγχεται η παρουσία κυτταροτοξικών αντισωμάτων με την εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα -CDC ή την στερεάς φάσης ELISA καθώς και με την κυτταρομετρία ροής (flow PRA screening test). Ο ειδικός έλεγχος αφορά τη διασταύρωση του ορού του λήπτη με λεμφοκύτταρα συγκεκριμένου υποψηφίου δότη για την ανίχνευση αντισωμάτων ειδικών έναντι των HLA-αντιγόνων του τελευταίου (δοκιμασία διασταύρωσης, crossmatch). Για την δοκιμασία διασταύρωσης εφαρμόζεται μια ευαίσθητη κυτταρομετρική μέθοδος (flow cytometry crossmatch-FCXM), η οποία αποτελεί παράγοντα απόρριψης του μοσχεύματος και πρέπει να γίνεται παράλληλα με την CDC μέθοδο.

Προκειμένου να αποτραπεί η ασθένεια του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή, χορηγούνται σε ασθενείς δόσεις των CD34 , επιφανειακών κυττάρων που δρουν σαν δείκτες για τον καθορισμό του σωστού χρόνου όπως και του σωστού μοσχεύματος για τη μεταμόσχευση μυελού των οστών.

## **Abstract**

One of the greatest achievements in medicine in the 20th century and are transplants . Devising and implementing transplant saved and continues to save thousands of lives around the world , because thanks to them, is given the possibility of replacing vital organs and tissues for humans . So there are cases where the bone marrow is either lacking or has been corrupted or infiltrated by malignant cells , expressing serious hematological diseases such as leukemia , bone marrow aplasia , etc. In a particular large number of our fellow citizens , including many children, die from these serious hematologic diseases because their bone marrow , the "factory" that makes the blood cells , it is severely damaged. The treatment of these diseases is attempted with various pharmaceutical forms, but often the only cure is bone marrow transplantation. Also the bone marrow transplantation is used to replace the cells of

the bone marrow that has been damaged by radiation or chemotherapy. The first successful bone marrow transplant took place in 1968 and today are almost 50,000 transplants each year . The bone marrow transplantation involves taking healthy stem cells from the bone marrow of a person and their transport in the bone marrow of the patient. In some cases , the patient may receive bone marrow from her own body. This method is known as autologous transplantation . Before returned, however , the bone marrow to the patient should be removed from any damaged or diseased cells . Apart from this method the treatment many times is based on the replacement of the patient's bone marrow cells from bone marrow of a healthy donor . This process is called allogeneic bone marrow transplantation .

In order , of course , the transplant to be successful it is absolutely essential that the donor and the recipient can exhibit tissue compatibility, i.e. the similarity of specific molecules ( HLA antigens) expressed on their cells . The HLA antigens, which are different in each person and determine the " Tissue identity" shall be determined in special histocompatibility laboratories on blood samples and the comparison of " Tissue Identity " of the two persons results the assessment of compatibility between them. However, in bone marrow transplantation the problem is not so much the rejection but the attack of the recipient's immune cells by the immunoreactive cells contained in the graft , which is known as graft versus host disease or GVHD and divided into acute and chronic depending on the organ necrosis that it cause.

For this reason the Pre-transplant immunological control is essential for the good outcome of transplantation and includes :

- Identification of HLA antigens
- The detection of anti -HLA ( cytotoxic ) antibodies
- The mixed lymphocyte culture (MLC), which is used only in living donor transplants because of long duration. With this method is estimated the in vitro response of recipient cells in the incompatibilities of HLA DR, DQ genes. Mixed culture is now replaced by molecular techniques, so is no longer used by most laboratories.

To determine the HLA class I and class II antigens are used serological methods using polyclonal or monoclonal anti-HLA antisera . The most widespread method is microcytotoxicity assay (microlymphocytotoxic test) or complement dependent cytotoxicity (CDC), which is based on antigen-antibody reaction on Terasaki plates, presence of rabbit complement . However, the application of molecular techniques has solved the problems of the class II antigens' determination, using the technique of PCR (PCR-SSP,-SSO) and RFLPs. These methods are rapid and permit to identify not only the specialties but also the slit and their subtypes .

As for the detection of anti-HLA antibodies applies the sensitization control in transplant candidates recipients, which is divided into general and specific control. The general control is searching for the presence of cytotoxic antibodies by CDC method or solid phase ELISA and by flow cytometry (flow PRA screening test). The specific control regards the junction of the recipient's serum to specific candidate donor's lymphocytes for the detection of specific antibodies against his HLA-antigens (crossmatch). For the crossmatching test is applied a sensitive cytometric method FCXM, which is a factor of graft rejection and should always be in parallel with the CDC method.

In order to prevent the graft-versus-host-disease, they are used CD34 doses in patients, surface cells that act like markers to define the perfect time such as the right graft for the bone marrow transplantation.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:**

1. Φωτόπουλος Α.Κ., Πραχαλιάς Α.: Η λήψη των οργάνων για μεταμόσχευση. Εις Ι.Α.Παπαδημητρίου (Εκδ) Μεταμοσχεύσεις Ζώων και Οργάνων, Μ.Γ. Παρισσιανού, Αθήνα 1998
2. Anderson J.E.: Bone marrow transplantation, Blood Rev., 2000
3. Μελέτης Ι. Χρ. : Αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού, 1988
4. E.O.M/www.iatronet.gr
5. Dausset J.: The major histocompatibility complex in man. Last, present and future concepts. Science, 1974: 1469-1474
6. Φάσσας Α.: Νεώτερες εξελίξεις στο χώρο της μεταμόσχευσης μυελού. Ανοσολογικά Θέματα '95, ΕΚΔΟΣΕΙΣ: Ζ. Πολυμενίδης. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1995:691-694
7. Goodman JW.: Antigen Presentation and the Major Histocompatibility Complex. Basic and Clinical Immunology, San Francisco 1994:58-65
8. <http://www.eom.gr>
9. Μεταμόσχευση μυελού των οστών. Οδηγός Πληροφόρησης. Δαμιανός Σωτηρόπουλος. Διαθέσιμο στο: [www.sillogoskarkinopathon.gr](http://www.sillogoskarkinopathon.gr)  
Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 09.11.13
10. Alan Stevens, James S. Lowe. Μετάφραση: Μυρσίνη Κουλούκουσα, Κωνσταντίνα Τηνιακού.: Ιστολογία του Ανθρώπου. ΕΚΔΟΣΕΙΣ: Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2005:120
11. Λεμφοκύτταρα Β. Γεώργιος Αλ. Μαθιουδάκης. Διαθέσιμο στο: [www.respi-gam.net/node/3575](http://www.respi-gam.net/node/3575) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 11.09.13
12. Διαταραχές του μυελού των οστών. Διαθέσιμο στο: [www.labtestsonline.html](http://www.labtestsonline.html) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 08.08.13
13. Σκαλέας Γρ.Α., Κωστάκης Α.: Προσφορά Ζωής (Μεταμοσχεύσεις Οργάνων), ΕΚΔΟΣΕΙΣ: Γρ. Παρισσιανός, 1983
14. Howell W.M, Evans P.R, Spellerberg M.B.: A comparison of serological, cellular and DNA-RFLP methods for HLA matching in the selection of related bone marrow donors. Bone Marrow Transplant, 1989:63-68



15. Επεξεργασία και έλεγχος του μυελού πριν και μετά τη μεταμόσχευση. Πετράκη Θεοδοσία. Διαθέσιμο στο: [www.entepa.gr/elearn/item/361-epexergasia-kai-elegchos-tou-myelou-prin-kai-meta-th-metamosxevsh.html](http://www.entepa.gr/elearn/item/361-epexergasia-kai-elegchos-tou-myelou-prin-kai-meta-th-metamosxevsh.html) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 11.06.13
16. Ε. Γερμενής Αναστάσιος. Ιατρική Ανοσολογία. ΕΚΔΟΣΕΙΣ: Παπαζήση, Αθήνα, 2000: 280-282, 284-285
17. Anasetti C, Amos D, Beatty P.G et al.: Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. N Engl J Med 320,1989:197-204
18. . Scornik J.C, Elfenbein G, Graham-Pole J, et al.: Role of anti-donor antibodies in bone marrow transplant rejection: evaluation by flow cytometry and effect of plasma exchanges. Transplant Proc 21,1989: 2974-2975
19. Flow PRA Screening. Διαθέσιμο στο: [www.onelambda.com](http://www.onelambda.com) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 04.01.14
20. Cai J, Terasaki P.I.: Human leukocyte antigen antibodies for monitoring transplant patients. Surg Today 2005:605-612
21. Μελέτης Γ.Χ.: Μεταμόσχευση μυελού των οστών. ΕΚΔΟΣΕΙΣ: ΝΗΡΕΑΣ, Αθήνα, 1989:49-66
22. Εφαρμογές τεχνολογίας ανασυνδυσμένου DNA. Διαθέσιμο στο: [www.biology.uoc.gr](http://www.biology.uoc.gr) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 17.09.13
23. Transplantation immunology: Solid Organ and bone marrow. Javier Chinen, Rebecca H. Buckley. Διαθέσιμο στο: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 28.11.13
24. HLA Testing. Διαθέσιμο στο: [www.labtestonline.html](http://www.labtestonline.html) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 10.07.13
25. Moore S.B, Ploeger N.A, DeGoey S.R: HLA antibody screening: Comparison of a solid phase enzyme-linked immunoassay with antiglobulin augmented lymphocytotoxicity. Transplantation 1997:64-1617

26. Κυτταρομετρία Ροής. Διαθέσιμο στο: [www.cytometry.org/web/index.php](http://www.cytometry.org/web/index.php)  
Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 13.11.13
27. Flow Cytometry PRA Using Pooled Lymphocytes for both HLA Class I and II Antibodies. Dong H. Won. Διαθέσιμο στο: [www.labmed.ascpjournals.org/content/42/1/17.full](http://www.labmed.ascpjournals.org/content/42/1/17.full) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 15.02.14
28. Νέα επαναστατική μέθοδος μεταμόσχευσης μυελού των οστών από μη συμβατό δότη. Διαθέσιμο στο: [www.koutipandoras.gr](http://www.koutipandoras.gr) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 25.11.13
29. Μεταμοσχεύσεις οργάνων «χωρίς ανοσοκαταστολή, χωρίς ιστοσυμβατότητα». Διαθέσιμο στο: [www.news.in.gr/science-technology/article/?aid=1231185460](http://www.news.in.gr/science-technology/article/?aid=1231185460) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 10.01.14
30. AIDS: Άλλοι δύο ασθενείς φαίνεται να έχουν θεραπευτεί μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών. Διαθέσιμο στο: [www.skai.gr/news/health/article/236711/aids-alloi-duo-astheneis-fainetai-na-ehoun-therapeutei-meta-apo-metamosheusi-muelou-ton-oston/#ixzz2uHZTSne1](http://www.skai.gr/news/health/article/236711/aids-alloi-duo-astheneis-fainetai-na-ehoun-therapeutei-meta-apo-metamosheusi-muelou-ton-oston/#ixzz2uHZTSne1) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 12.07.13
31. Πρωτοποριακές εξελίξεις στη μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων. Διαθέσιμο στο: [www.iatronet.gr](http://www.iatronet.gr) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 13.01.14
32. Μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων (περιφερικού αίματος, μυελού των οστών και αίματος ομφάλιου λώρου). Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία. Διαθέσιμο στο: [www.cancer.org](http://www.cancer.org) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 30.06.14
33. Τι να περιμένουμε πριν από μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων αίματος και μυελού. Εθνικό Ινστιτούτο Καρδιάς Πνευμόνων και Αίματος. Διαθέσιμο στο: [www.nhlbi.nih.gov](http://www.nhlbi.nih.gov) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 05.07.14
34. Αξιολογώντας την υγεία σας πριν από τη μεταμόσχευση. Εθνικό Πρόγραμμα Δοτών Μυελού των Οστών. Διαθέσιμο στο : [www.marrows.org](http://www.marrows.org) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 10.08.14

35. Μιλώντας για μεταμόσχευση. Η προετοιμασία για τη μεταμόσχευση.  
Ηνωμένο Δίκτυο Καταμερισμού Οργάνου. Διαθέσιμο στο:  
[www.unos.org](http://www.unos.org) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 10.08.14
36. Δρ. Άννα Ιωαννίδου-Παπακωνσταντίνου. Αιματολογία II.  
ΕΚΔΟΣΕΙΣ:ΒΗΤΑ Ιατρικές Εκδόσεις ΜΕΠΕ. Αθήνα, 2000:278-284
37. Ελένη Βαγδατλή, Ιατρός Βιοπαθολόγος- Καθηγήτρια ΑΤΕΙ  
Θεσσαλονίκης. Νεοπλασίες του Αίματος και Αιμόσταση.  
ΕΚΔΟΣΕΙΣ:ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΑΛΤΙΝΤΖΗ. Αθήνα, 2009:23-26
38. Βασιλική Ε. Καλοδήμου, Μοριακή Γενετίστρια, Υπ. Τμήματος  
Κυτταρομετρίας Ροής-Έρευνας & Αναγεννητικής Ιατρικής Μαιευτηρίου  
ΙΑΣΩ. Προσδιορισμός CD34<sup>+</sup> αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.  
Διαθέσιμο στο: [www.kyttarometria.gr](http://www.kyttarometria.gr) Τελευταία ημερομηνία  
πρόσβασης 09.08.14
39. Έφη Καλπάκη, Βιολόγος. Νοσοκομειακή Υπηρεσία Αιμοδοσίας  
Νοσοκομείου ΜΕΤΑΞΑ.ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ  
ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ. Διαθέσιμο στο:  
[www.tntexecutive.gr](http://www.tntexecutive.gr) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 09.08.14
40. Κυτταρομετρία Ροής. Διαθέσιμο στο: [www.clinical.bioiatriki.gr](http://www.clinical.bioiatriki.gr)  
Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 09.08.14
41. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ – ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ Ι. Αιμοποίηση, Μυελός των οστών.  
Διαθέσιμο στο:  
[http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus\\_I/aimopiisi/aimopiisi/mielos  
/index.htm#](http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_I/aimopiisi/aimopiisi/mielos/index.htm#) Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 05.10.14
42. Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων. Διαθέσιμο στο:  
<http://www.elpida.org> Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 05.10.14
43. Δέσποινα Μαρίτση, Παιδίατρος- Παιδορευματολόγος. Αναρρόφηση του  
μυελού των οστών και οστεομυελική βιοψία. Διαθέσιμο στο:  
<http://www.paidoreumatologos.gr> Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης  
06.10.14
44. Γιάννης Χρ. Μελέτης, Παθολόγος-Αιματολόγος, Αναπληρωτής  
Καθηγητής Α' Παθολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Νοσοκομείο «Γενικό Λαϊκό», Ευάγγελος Τέρπος, Αιματολόγος,

Επιμελητής Α', Αιματολογική Κλινική 251, Γενικό Νοσοκομείο  
Αεροπορίας. **ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ-  
Προβλήματα και προοπτικές για την αντιμετώπιση αρρώστων με  
λεμφώματα. Διαθέσιμο στο:**

[http://www.bionova.gr/med/uploads/texts/metamosxefsi\\_mielou.pdf](http://www.bionova.gr/med/uploads/texts/metamosxefsi_mielou.pdf)

Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 02.10.12

45. K. Nakase, M. Hara, T. Kozuka, K. Tanimoto και Y. Nawa. Bone marrow transplantation from unrelated donors for patients with adult T-cell leukaemia/lymphoma. Διαθέσιμο στο: <http://www.nature.com>

Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 03.10.14

46. A. J. Peniket, M. C. Ruiz de Elvira, G. Taghipour και άλλοι. Lymphoma. An EBMT registry matched study of allogeneic stem cell transplants for lymphoma: allogeneic transplantation is associated with a lower relapse rate but a higher procedure-related mortality rate than autologous transplantation. Διαθέσιμο στο:

<http://www.nature.com/bmt/journal/v31/n8/full/1703891a.html>

Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 03.10.14

47. Δανιηλίδης Μιχαήλ. Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας του ανθρώπου. ΕΚΔΟΣΕΙΣ: Πήγασος, Θεσσαλονίκη, 2000:11-15

48. I. Fatorova, M. Blaha, M. Lanska, D. Vokurkova, V. Rezacova, και P. Zak. Research Article. Timing of Peripheral Blood Stem Cell Yield: Comparison of Alternative Methods with the Classic Method for CD34<sup>+</sup> Cell Determination. Διαθέσιμο στο:

<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/575368> Τελευταία

[ημερομηνία πρόσβασης 04.10.14](http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/575368)

49. S Heimfeld. Bone marrow transplantation: how important is CD34 cell dose in HLA-identical stem cell transplantation? Διαθέσιμο στο:

<http://www.nature.com/leu/journal/v17/n5/full/2402893a.html> Τελευταία

ημερομηνία πρόσβασης 04.10.14

50. Sergio Querol, Ghulam J. Mufti, Steven G.E. Marsh και άλλοι. Cord Blood Stem Cells For Hematopoietic Stem Cell Transplantation In The UK: How Big Should The Bank Be? Διαθέσιμο στο:

<http://www.haematologica.org> Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης

04.10.14

51. John E. Wagner, Juliet N.Barker, Todd E.DeFor, K. Scott Baker και άλλοι. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. Διαθέσιμο στο: <http://www.bloodjournal.org> Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 05.10.14
52. Gajkowska, A., Oldak, T., Jastrzevska, M., Machaj, E.K., Walewski, J., Kraszewska, E., Pojda, Z. Folia Histochem. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of the three methods. Διαθέσιμο στο: <http://www.wikigenes.org/e/ref/e/16584093.html> Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 06.10.14
53. CHEN Yu-hong, XU Lan-ping, LIU Dai-hong, CHEN Huan. Comparative outcomes between cord blood transplantation and bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors in patients with hematologic malignancies: a single-institute analysis. Διαθέσιμο στο: <http://www.cmj.org> Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 06.10.14
54. Junya Kanda. Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease. Διαθέσιμο στο: <http://link.springer.com> Τελευταία ημερομηνία πρόσβασης 01.10.14



