

18. ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ

Το σύστημα HLA

Εισαγωγή

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

Τα αντιγόνα δεν συνδέονται μόνο με τα αντισώματα που παράγουν τα Β λεμφοκύτταρα αλλά και με υποδοχείς που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων. Οι υποδοχείς αυτοί ονομάζονται **TCR (T cell receptor)**. Η ύπαρξη των TCR υποδοχέων είναι χαρακτηριστική για τα Τ λεμφοκύτταρα και είναι αυτά που τα διαφοροποιούν από τα Β λεμφοκύτταρα.

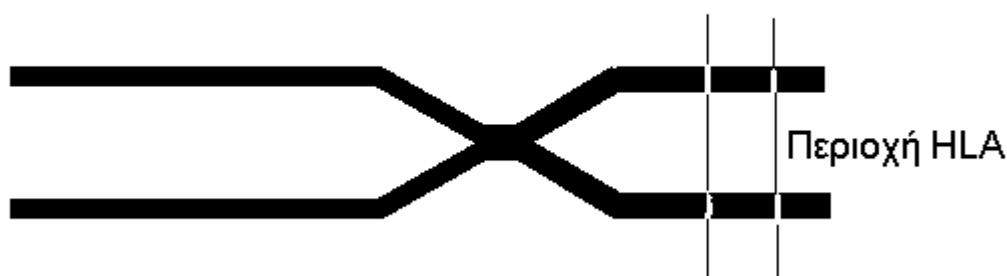
Οι υποδοχείς TCR μαζί με τον γειτονικό μεμβρανικό υποδοχέα CD₃ συνδέονται με τα αντιγόνα που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια άλλων λεμφοκυττάρων (αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων-APC και κυττάρων στόχων). Για να συνδεθούν οι υποδοχείς TCR με τα αντιγόνα θα πρέπει τα αντιγόνα να είναι συνδεδεμένα με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς που ονομάζονται αντιγόνα του **μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC (Major Histocompatibility Complex)**. Τα αντιγόνα MHC είναι γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης που υπάρχουν σε πολλές ομάδες κυττάρων. Συνδέονται με αντιγόνα που προέρχονται είτε από το εσωτερικό των κυττάρων είτε από το περιβάλλον χώρο. Η σύνδεση MHC-Ag είναι αυτή και μόνο αυτή που μπορούν να αναγνωρίσουν οι υποδοχείς TCR/CD3 που βρίσκονται στην επιφάνεια των T₄ και T₈ λεμφοκυττάρων (Εικ. 18.6). Στο ίδιο σύστημα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας ανήκει και το σύστημα ABO.

Το σύστημα HLA

Για τα αντιγόνα MHC του ανθρώπου έχει επικρατήσει η ονομασία **HLA (Human Leucocyte antigens)**. Πρόκειται για ένα σύστημα αντιγόνων τα οποία όπως και τα MHC εκφράζονται από γονίδια που βρίσκονται πάνω στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (Εικ. 18.1).

Τα γονίδια HLA αντιπροσωπεύουν το 0,1% της όλης γενετικής πληροφορίας και περιλαμβάνει περισσότερα από εκατό σε αριθμό γονίδια που διακρίνονται με τεχνητό τρόπο σε τρία μεγάλα αθροίσματα (clusters) τα οποία οργανώνονται στο χρωμόσωμα 6 από το τελομέρος στο κεντρομέρος ως εξής: α) **τάξης I**, β) **τάξης III** και γ) **τάξης II**. Κάθε ένα από αυτά τα αθροίσματα περιέχει πολλές γονιδιακές θέσεις (loci) κάθε μια από τις οποίες εκφράζεται με πολλές γονιδιακές μορφές ή αλληλόμορφα στο χρωμόσωμα (Εικ. 18.5).

Τα αντιγόνα HLA που εκφράζονται από τα αντίστοιχα γονίδια HLA παίρνουν μέρος στην ενδοκυττάρια μεταφορά, παρουσίαση και αναγνώριση του αντιγόνου πεπτιδίου, κατά την ανάπτυξη της ειδικής ανοσιακής απάντησης.



Εικόνα 18.1. Το χρωμόσωμα 6 όπου βρίσκονται τα γονίδια HLA

Περιγραφή των μορίων MHC τάξης I

Τα MHC τάξης I μόρια (HLA-A, B και -Cw¹) είναι γλυκοπρωτείνες της κυτταρικής μεμβράνης που **βρίσκονται σε όλα τα εμπύρνα κύτταρα του οργανισμού**. Αποτελούνται από δύο τμήματα:

- Την β2 μικροσφαιρίνη, η σύνθεση της οποίας κωδικοποιείται από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 15, δεν παρουσιάζει πολυμορφισμό και έχει μεγάλη δομική ομοιότητα με τις ανοσοσφαιρίνες.
- Την α αλυσίδα, η σύνθεση της οποίας κωδικοποιείται από το HLA τάξης I γονίδιο και εμφανίζει υψηλού βαθμού πολυμορφισμό. Αποτελείται από τρία εξωκυττάρια πεδία με 90 περίπου αμινοξέα το κάθε ένα: το α1, α2 και α3 (με σειρά από το ελεύθερο αμινοτελικό άκρο), ένα διαμεμβρανικό τμήμα μήκους 40 περίπου αμινοξέων και ένα υδρόφιλο καρβοξυτελικό άκρο μήκους 30 αμινοξέων.

Το προσκείμενο στην κυτταρική μεμβράνη τμήμα του μορίου αποτελείται από το α3 εξωκυττάριο πεδίο της βαριάς αλυσίδας και τη β2 μικροσφαιρίνη ενώ το αντιγόνο συνδέεται με την σχισμοειδή θήκη (groove ή cleft) που σχηματίζεται μεταξύ των τμημάτων α1 και α2 (Εικ. 18.2).

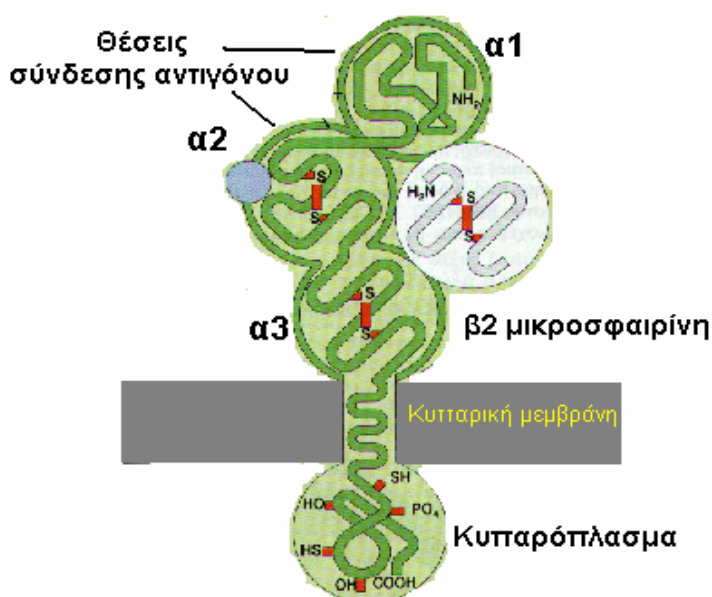
Η **σχισμοειδή θήκη** εντοπίζεται στην κορυφή του μορίου MHC I και αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες πεπτιδικές αλυσίδες με δομή α έλικας υποστηριζόμενες από οκτώ αντιπαράλληλες πεπτιδικές αλυσίδες που συγκρατούνται μεταξύ τους με σχηματισμό β πτυχωτού φύλλου. Διαμορφώνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι δύο α έλικες να σχηματίζουν τα τοιχώματα ενώ οι αλυσίδες του β πτυχωτού φύλλου το δάπεδο της θήκης. Η πλειονότητα των πολυμορφικών αλληλουχιών εντοπίζεται στο δάπεδο της θήκης που δέχεται το αντιγονικό πεπτίδιο ή στα τοιχώματα που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα του T-λεμφοκυττάρου. Η σχισμοειδή θήκη των μορίων MHC I και MHC II έχει παρόμοια δομή (Εικ. 18.4). Τα μόρια MHC τάξης I συνδέονται με **ενδογενή αντιγόνα** μήκους 8-11 αμινοξέων.

Περιγραφή των μορίων MHC τάξης II

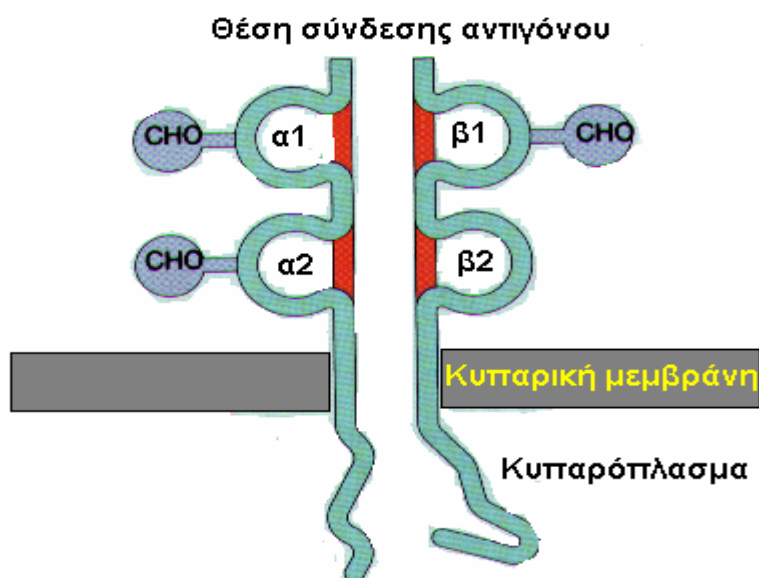
Τα **HLA (ή MHC) τάξης II μόρια (-DR, -DQ, -DP)** είναι και αυτά γλυκοπρωτείνες κυτταρικής μεμβράνης που **εκφράζονται σε ορισμένες ομάδες κυττάρων** όπως είναι τα **αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC)**, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου. Η παραγωγή τους διεγείρεται όπως και στα HLA μόρια τάξης I από την ιντερφερόνη γ (IFNγ).

¹ Η ονομασία Cw αντικατέστησε την παλιά ονομασία C για να μην συγχέεται με το συμπλήρωμα

Αποτελούνται από μια βαριά α και μια ελαφριά β αλυσίδα. Το μεγαλύτερο μοριακό βάρος της α αλυσίδας οφείλεται στην μεγαλύτερη γλυκοζυλίωση του μορίου. Κάθε αλυσίδα κωδικοποιείται από διαφορετικό MHC τάξης II γονίδιο, παρουσιάζει μεγάλο πολυμορφισμό και αποτελείται από ένα εξωκυττάριο (μήκους περίπου 180 αμινοξέων), ένα διαμεμβρανικό (μήκους περίπου 30 αμινοξέων) καθώς και ένα ενδοκυττάριο τμήμα. Το εξωκυττάριο αμινοτελικό τμήμα τόσο της α όσο και της β αλυσίδας διακρίνεται σε δύο επιμέρους πεδία α1, α2 και β1, β2 αντίστοιχα από τα οποία τα α1, β1 είναι εξαιρετικά πολυμορφικά και σχηματίζουν τη σχισμοειδή θήκη δέσμευσης του αντιγονικού πεπτιδίου (Εικ. 18.3). Τα μόρια MHC τάξης II **συνδέονται με εξωγενή αντιγόνα** (από πρωτείνες, βακτήρια κ.α.) μήκους 10-30 αμινοξέων.

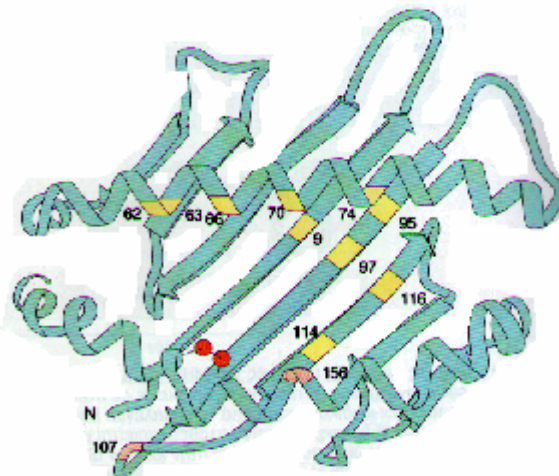


Εικόνα 18.2. Η δομή του μορίου MHC τάξεως I



Εικόνα 18.3. Η δομή του μορίου MHC τάξεως II

Σχισμοειδής θήκη σύνδεσης αντιγόνου



Εικόνα 18.4. Η σχισμοειδής θήκη (θέση σύνδεσης αντιγόνου και μορίου HLA)

Περιοχή HLA τάξης I πάνω στο χρωμόσωμα 6

Η περιοχή τάξης I καταλαμβάνει έκταση 2×10^6 bp κοντά στο τελομέρος του χρωμοσώματος 6 και περιέχει 6 γονιδιακές θέσεις **που κωδικοποιούν τις α βαριές αλυσίδες των HLA τάξης I μορίων** (βλ. παρακάτω). Μεταξύ αυτών οι «κλασσικές» **HLA-A, -B και -C γονιδιακές θέσεις** παρουσιάζουν εντυπωσιακό πολυμορφισμό (349 HLA-A, 349 HLA-B, 90 HLA-C γνωστά αλληλόμορφα). Οι ονομαζόμενες «μη κλασσικές» τάξης I γονιδιακές θέσεις (HLA-E, -F και -G) είναι πολύ λιγότερο πολυμορφικές ενώ τελευταίες μελέτες αποκάλυψαν και νέες μη κλασσικές θέσεις όπως τις HLA-H, HLA-J, HLA-K και HLA-L.

Τα MHC τάξης I γονίδια είναι οργανωμένα σε 8 μεταγραφόμενες (εξόνια) και 7 μη μεταγραφόμενες (ιντρόνια) περιοχές. Αναλυτικότερα, το εξόνιο I κωδικοποιεί το οδηγό πεπτίδιο, τα εξόνια 2, 3 και 4 τη σύνθεση των εξωκυττάριων πεδίων $\alpha 1$, $\alpha 2$ και $\alpha 3$ αντίστοιχα το εξόνιο 5 τη σύνθεση του διαμεμβρανικού τμήματος ενώ τα εξόνια 6, 7 και 8 περιέχουν το μήνυμα για την σύνθεση του ενδοκυττάριου τμήματος του μορίου. Η πλειονότητα των μεταβλητών περιοχών περιέχεται στα εξόνια 2 και 3 και κατά συνέπεια η μεγάλη πολυμορφία των μορίων MHC τάξης I οφείλεται στην πολυμορφία των περιοχών $\alpha 1$ και $\alpha 2$ όπου γίνεται και η σύνδεση με διαφορετικό κάθε φορά ενδογενές πεπτίδιο-αντιγόνο.

Περιοχή HLA τάξης II πάνω στο χρωμόσωμα 6

Η τάξης II περιοχή καταλαμβάνει έκταση 1×10^6 bp κοντά στο κεντρομέρος του χρωμοσώματος 6 και **διακρίνεται σε πέντε υποπεριοχές DP, DN, DM, DQ και DR**. Κάθε μια από αυτές τις υποπεριοχές (εκτός των DN και DM) περιέχουν περισσότερες από μια γονιδιακές θέσεις (τουλάχιστον ένα A και ένα B αλληλόμορφο γονίδιο) που κωδικοποιούν τη σύνθεση των α και β αλυσέων των αντίστοιχων MHC τάξης II μορίων τα οποία παρουσιάζουν εξωγενή αντιγονικά πεπτίδια στον υποδοχέα των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων (CD_4).

Γενετικά ενεργείς περιοχές είναι οι DP, DQ και DR. Η DR υποπεριοχή περιέχει μία DRA γονιδιακή θέση, μη πολυμορφική, υπεύθυνη για τη σύνθεση της α αλυσίδας και εννέα DRB γονιδιακές θέσεις, από τις οποίες οι τέσσερις είναι λειτουργικές ενώ οι άλλες πέντε ψευδογονίδια. Ειδικότερα το DRB1 γονίδιο είναι το πλέον πολυμορφικό των τάξεως II γονιδίων (>130 αλληλόμορφα). Τα γονίδια DRB3,

DRB4 και DRB5 κωδικοποιούν τις αλυσίδες DRβ3, DRβ4 και DRβ5 ενώ τα γονίδια DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 και DRB9 είναι ψευδογονίδια και δεν εκφράζονται.

Οι DQ και DP περιοχές έχουν η κάθε μια από δύο A και δύο B γονίδια DQA1, DQA2, DQB1, DQB2 και DPA1, DPA2, DPB1, DPB2. Τα προϊόντα των DPA1 και DPB1 γονιδίων τα οποία είναι και τα δύο πολυμορφικά συνδέονται και σχηματίζουν τα DP μόρια ενώ τα DPA2 και DPB2 είναι ψευδογονίδια. Παρόμοια και για τα γονίδια DQ εκφράζονται μόνο τα DQA1 και DQB1 ενώ τα DQA2 και DQB2 είναι ψευδογονίδια.

Περιοχή MHC τάξης III πάνω στο χρωμόσωμα 6

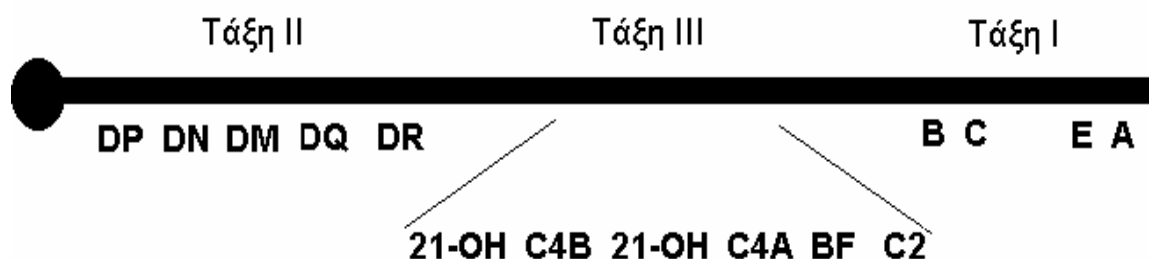
Η τάξης III περιοχή καταλαμβάνει έκταση 1×10^6 bp και εντοπίζεται μεταξύ των τάξεων I και II. Πάνω από 40 γονίδια εδράζονται σε αυτή την περιοχή. Μεταξύ αυτών ξεχωρίζουν τα γονίδια του συμπληρώματος C2, Bf και C4, το γονίδιο της 21-υδροξυλάσης, τα γονίδια των κυτταροκινών TNFα και TNFβ, τα γονίδια της θερμικής θερμοπληξίας HSP 70-1 και HSP 70-2 κ.α.

Βιολογικός ρόλος του συστήματος MHC (HLA)

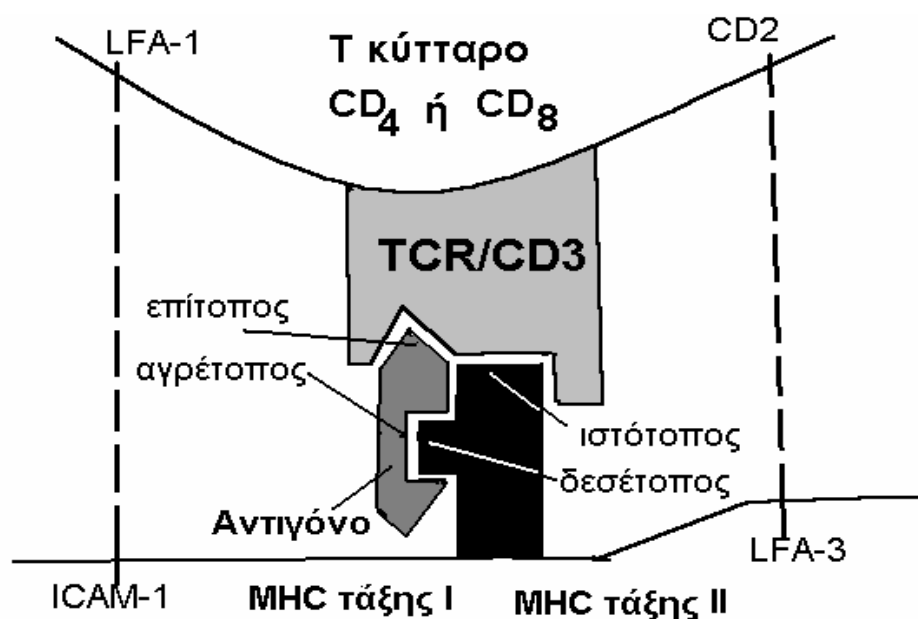
Η πραγματική λειτουργία του MHC είναι ότι χρησιμεύει στην αναγνώριση των μορίων του ιδίου του οργανισμού και στην διάκριση τους από ξένα μόρια. Τα MHC τάξης I περιορίζουν την αναγνώριση του αντιγόνου από τα T κυτταροτοξικά κύτταρα και τα MHC τάξης II από τα T βοηθητικά και T κατασταλτικά. Ο υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων (TCR) δηλαδή δεν μπορεί να αναγνωρίσει το αντιγόνο εκτός αν το «δει» μαζί με ένα MHC αντιγόνο. Τα MHC τάξεως I ενώνονται με ενδογενή αντιγόνα ενώ τα MHC τάξεως II με εξωγενή.

Το πρώτο βήμα κατά την ανοσοαπάντηση είναι η παραλαβή του αντιγόνου από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC). Ακολουθεί η επεξεργασία του. Συγκεκριμένα τα **εξωγενή αντιγόνα** (π.χ. διαλυτές πρωτεΐνες, τμήματα ιών αλλά και ολόκληροι ιοί), εισέρχονται στο κύτταρο APC με ενδοκύτωση. Ακολουθεί η ενσωμάτωση τους στα λυσοσώματα όπου και συντελείται η επεξεργασία τους. Ακολουθεί η μεταφορά τους και η τοποθέτησή τους πάνω στα αντιγόνα **MHC τάξης II** της κυτταρικής μεμβράνης. Αντίθετα τα **ενδογενή αντιγόνα**, π.χ. αντιγόνα κυτταρικής μεμβράνης ή κυτταροπλασματικά αντιγόνα επεξεργάζονται στη διάρκεια της μεταφοράς τους ενδοκυττάρια χωρίς την μεσολάβηση των λυσοσωμάτων. Τα ενδογενή αντιγόνα παρουσιάζονται μόνο σε σχέση με τα **MHC τάξης I μόρια**. Σε κάθε περίπτωση ακολουθεί η παρουσίαση των αντιγόνων στους υποδοχείς TCR των T-λεμφοκυττάρων.

Τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το σύμπλεγμα αντιγόνο+MHC με το ειδικό σύμπλεγμα του T-υποδοχέα (TCR/CD₃). Τα CD₄ T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα τα οποία είναι συνδεδεμένα με τα HLA τάξης II, ενώ τα CD₈ T-λεμφοκύτταρα με HLA τάξης I.



Εικόνα 18.5. Οι θέσεις των γονιδίων HLA πάνω στο χρωμόσωμα 6



Εικόνα 18.6. Σύνδεση αντιγόνου+μορίου MHC+υποδοχέα TCR και η σχετική ορολογία

Κληρονομική μεταβίβαση του συστήματος HLA

Κάθε άτομο κληρονομεί δύο χρωμοσώματα 6, ένα από τον πατέρα του και ένα από την μητέρα του. Τα αντιγόνα HLA μεταβιβάζονται σύμφωνα με τους νόμους της κληρονομικότητας του Mendel. Ο συνδυασμός των HLA γονιδίων που συνδέονται στενά πάνω στο ίδιο χρωμόσωμα και κληρονομούνται από τον ένα γονέα ονομάζεται **απλότυπος (haplotype)**. Οι δύο απλότυποι ενός ατόμου σύμφωνα με τη σειρά των γονιδίων πάνω στο χρωμόσωμα όπως αυτά προκύπτουν από την HLA τυποποίηση παριστά τον **φαινότυπο**.

Παράδειγμα

Απλότυποι: A1, B12, Cw1, DP5, DQ1
A2, B8, Cw3, DR3, DQ2

Γονότυπος: A1, B12, Cw1, DR5, DQ1 / A2, B8, Cw3, DR3, DQ2

Φαινότυπος: A1, A2 / B8, B12 / Cw1, Cw3 / DR3, DR5 / DQ1, DQ2

Ομοιότητα ως προς τα HLA αντιγόνα μεταξύ μη συγγενών είναι σπάνια. Το αντίθετο συμβαίνει μεταξύ συγγενών π.χ. αδελφών. Αν τα παιδιά ενός ζευγαριού έχουν κληρονομήσει τους ίδιους απλότυπους είναι **HLA-ταυτόσημα (identical)** ενώ αν έχουν ένα μόνο κοινό απλότυπο είναι **απλοταυτόσημα (haploidentical)**. Είναι αυτονόητο ότι τα παιδιά ενός ζευγαριού είναι πάντοτε απλοταυτόσημα με καθένα γονέα γιατί κάθε άτομο κληρονομεί έναν απλότυπο από την μητέρα και έναν από τον πατέρα. Σύμφωνα λοιπόν με τους νόμους του Mendel υπάρχει πιθανότητα 25% δύο αδέρφια να έχουν κοινούς απλότυπους (HLA-ταυτόσημα), 50% να μοιράζονται έναν κοινό απλότυπο (HLA-απλοταυτόσημα) και 25% να μην έχουν κανένα κοινό απλότυπο (HLA-ασύμβατα).

Εφαρμογές της HLA τυποποίησης

1. Μεταμόσχευση ιστών και οργάνων

Τα αντιγόνα των κυτταρικών επιφανειών που αποτελούν τον κύριο στόχο στις απορριπτικές αντιδράσεις έναντι των μοσχευμάτων ανήκουν κυρίως στα μείζονα συστήματα ιστοσυμβατότητας (HLA σύστημα, σύστημα ABO και Rhesus των ερυθροκυττάρων).

Ο προμεταμοσχευτικός έλεγχος περιλαμβάνει:

A) Σύστημα ABO.

Ο λήπτης και ο δότης ελέγχονται για τα αντιγόνα ABO. Ακολουθούνται οι ίδιοι κανόνες με τις μεταγγίσεις αίματος. Το πρόβλημα οφείλεται στην παρουσία αιμοσυγκολλητινογόνων α και β στο ενδοθήλιο των αγγείων. Τα αντιγόνα του συστήματος Rhesus δεν βρίσκονται στο ενδοθήλιο των αγγείων και γι' αυτό δεν αποτελούν πρόβλημα.

B) Ιολογικός έλεγχος.

Γίνεται έλεγχος για αντισώματα για ηπατίτιδες (B και C), HIV, λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό (CMV), έρπητα (HSV) στο ζεύγος δότη-λήπτη. Ιδιαίτερη σημασία έχουν τα αντι-CMV τάξης IgM, γιατί η ύπαρξη λοίμωξης ή η αναζωπύρωση μπορεί να οδηγήσει σε απόρριψη του μοσχεύματος.

Γ) HLA-A, -B, -C –DR, -DQ τυποποίηση δότη και λήπτη.

Γίνεται με την μέθοδο της μικρολεμφοκυτταροτοξικότητας αφού προηγηθεί η απομόνωση των επιθυμητών κυττάρων με την μέθοδο των ανοσομαγνητικών σφαιριδίων.

Γ) Δοκιμασία διασταύρωσης μεταξύ δότη και λήπτη (crossmatch).

Το crossmatch χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της παρουσίας αντισωμάτων (προευσαιθητοποίηση) στον ορό του λήπτη έναντι των HLA αντιγόνων του δότη. Τα αντι-HLA αντισώματα μπορούν να σχηματιστούν μετά από εγκυμοσύνη, μετάγγιση αίματος και απόρριψη αλλομοσχεύματος. Στο Crossmatch διασταυρώνεται ο ορός του λήπτη με τα λεμφοκύτταρα (T και B ή μόνο T) του δότη με τη μέθοδο της μικρολεμφοκυτταροτοξικότητας.

Δ) Μεικτή καλλιέργεια λεμφοκυττάρων (MLC) δότη και λήπτη.

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 μεικτή καλλιέργεια έχει σήμερα αντικατασταθεί από μοριακές τεχνικές.

Ε) Μη ειδική δοκιμασία διασταύρωσης (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 σχηματίζονται μετά από κύηση, μετάγγιση ή απόρριψη προηγούμενου μοσχεύματος. PRA > 70 % οδηγεί σε απόρριψη του μοσχεύματος.

2. Έλεγχος αμφισβητούμενης πατρότητας

Η συμβολή των HLA αντιγόνων στον αποκλεισμό πατρότητας είναι σημαντική και ήρθε να προστεθεί στα ήδη χρησιμοποιούμενα συστήματα ελέγχου πατρότητας (αντίγονα, ένζυμα ερυθροκυττάρων, πρωτείνες ορού).

Το HLA σύστημα πληρεί απόλυτα τους όρους για την χρησιμοποίησή του στον έλεγχο πατρότητας γιατί τα αντίγονα του α) κληρονομούνται με γνωστό και σταθερό τρόπο, β) εμφανίζονται από την γέννηση, γ) παραμένουν σταθερά σε όλη την ζωή και δ) ελέγχονται με ακριβείς και επαναλήψιμες μεθόδους.

Η γενετική ασυμβατότητα πιθανού πατέρα και παιδιού καθορίζει την αθωότητα ενός κατηγορούμενου για πατρότητα άνδρα, ενώ η γενετική συμβατότητα δεν αποδεικνύει απαραίτητα την ταυτότητα. Η πιθανότητα ενός άνδρα να είναι πράγματι ο βιολογικός πατέρας ενός παιδιού υπολογίζεται με πολύπλοκα μαθηματικά σχήματα και με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή λαμβάνοντας υπ'όψη τις συχνότητες των HLA αντιγόνων και των απλοτυπικών τους συνδυασμών στην πληθυσμιακή ομάδα στην οποία ανήκει ο φερόμενος ως «πατέρας».

Η μεγάλη ποικιλία των πιθανών απλοτύπων κάνει το σύστημα εξαιρετικά πολύπλοκο συγχρόνως όμως και μεγάλης αξίας. Προβλήματα όπως πιθανή χιασματυπία, διασταυρούμενες αντιδράσεις, σφάλματα κατά τις μεθόδους δεν αλλοιώνουν πρακτικά την αξία της συμβολής του συστήματος. Ο συνδυασμός της HLA τυποποίησης με τις δοκιμασίες ελέγχου αντιγονικών συστημάτων των ερυθρών ανεβάζει το ποσοστό αποκλεισμού πιθανού πατέρα σε 97% (τα αντιγονικά συστήματα των ερυθρών αποκλείουν σε ποσοστό περίπου 70%). Ο συνδυασμός HLA, ερυθρών αιμοσφαιρίων και απτοσφαιρίων αποκλείει μέχρι 99%.

Άλλες εφαρμογές των HLA

Η γνώση των HLA αντιγόνων έχει επιπλέον μεγάλη σημασία σε **φυλογενετικές μελέτες** δηλ. μελέτες της ανθρώπινης εξέλιξης καθώς και της τυχόν γενετικής συγγένειας μεταξύ διαφορετικών ανθρώπινων πληθυσμών. Επίσης τα αντίγονα HLA σχετίζονται και με διάφορες **ασθένειες** όπου παίζουν ρόλο στην διάγνωση, στην πρόληψη ή και στην θεραπεία τους.

Ορολογική τυποποίηση των HLA αντιγόνων

Αρχή της μεθόδου

Ένωση αντιγόνου (αντιγόνο HLA κυτταρικής μεμβράνης) με ειδικό αντίσωμα (αντιορός HLA) παρουσία περίσσειας συμπληρώματος προκαλεί βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης (οπές) και θάνατο του κυττάρου.

Η διαδικασία χωρίζεται σε πέντε στάδια.

Στο **πρώτο στάδιο** απομονώνουμε τα λεμφοκύτταρα από ολικό αίμα (γενική αίματος) που παίρνουμε από τον δότη ή τον λήπτη της μεταμόσχευσης. Η απομόνωση γίνεται με την χρήση του αντιδραστηρίου της **φικόλης** (Ficoll-Isopaque).

Στο **δεύτερο στάδιο απομονώνουμε** τα επιθυμητά λεμφοκύτταρα T ή B με την μέθοδο των **ανοσομαγνητικών σφαιριδίων**.

Στο **τρίτο στάδιο** εφαρμόζεται η καθιερωμένη τεχνική της **μικρολεμφοκυτταροτοξικότητας**. Τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα αντιδρούν με αντισώματα αντι-HLA 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.

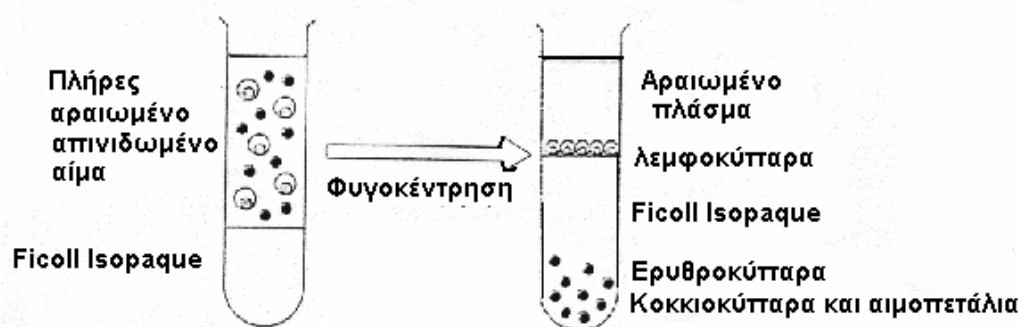
Στο **τέταρτο** στάδιο ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη χρωστική **μικροσκοπούμε** είτε σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού ή σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσεως. Το τελικό αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως 8, 6, 4, 2, 1 ανάλογα με το ποσοστό των νεκρών κυττάρων ανά οπτικό πεδίο.

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.

Αναλυτικότερα:

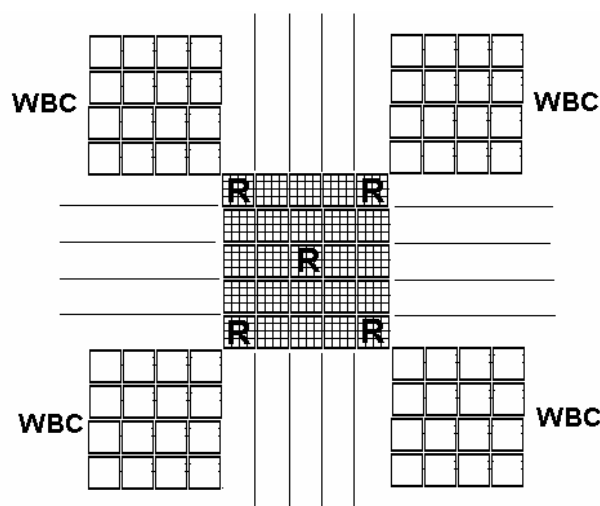
Πρώτο στάδιο.

Η απομόνωση των συνολικών λεμφοκυττάρων από δείγμα γενικής αίματος γίνεται με το αντιδραστήριο της φικόλης όπως περιγράφηκε στο δεύτερο μάθημα. Το Ficoll έχει μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνα και έτσι αυτά καθιζάνουν στον πάτο. Αντιθέτως έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από τα λεμφοκύτταρα που μαζεύονται έτσι στην ενδιάμεση στιβάδα (Εικ. 18.7).



Εικόνα 18.7. Απομόνωση λεμφοκυττάρων με την μέθοδο της φικόλης

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. 18.8). Επαρκής θεωρείται ο αριθμός των 3000 κυττάρων/μλ. Αν ο αριθμός των λεμφοκυττάρων είναι μικρότερος τότε επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση με φικόλη.



Εικόνα 18.8. Το μικροσκοπικό πλέγμα της πλάκας Neubauer

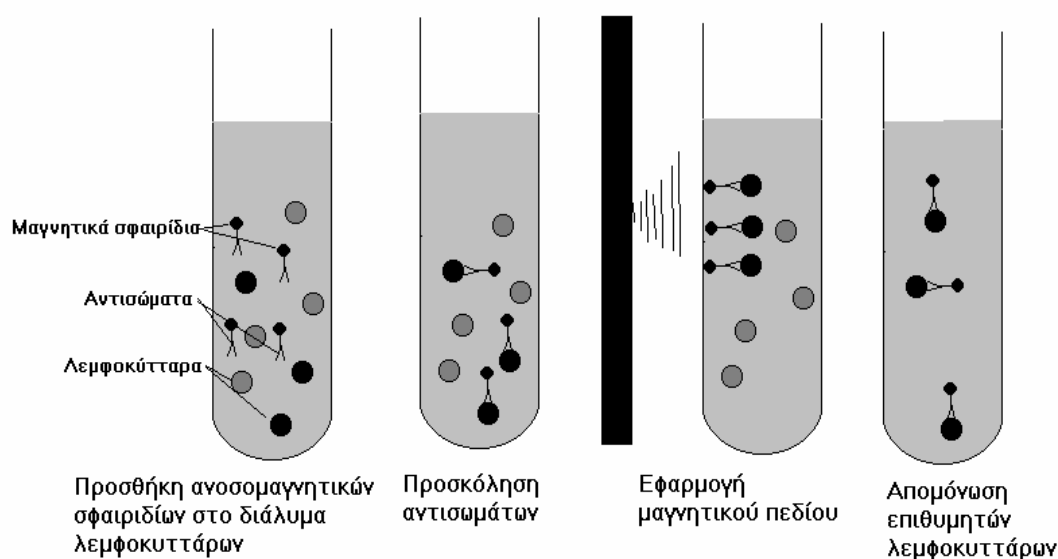
Δεύτερο στάδιο.**Απομόνωση λεμφοκυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια.**

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)**. Πρόκειται για μικροσκοπικά σφαιρίδια στην επιφάνεια των οποίων έχουν προσροφηθεί μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για τα κύτταρα που θέλουμε να απομονώσουμε.

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. 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 (Εικ. 18.9).



Εικόνα 18.9.

Απομόνωση συγκεκριμένης τάξης λεμφοκυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια

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.

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.

γ) **συμπλήρωμα:** ως πηγή χρησιμοποιείται ορός κονίκλου. Ορός από 50 περίπου κονίκλους συλλέγεται και ελέγχεται για τοξικότητα και δραστηριότητα (τιτλοποίηση) με τη βοήθεια γνωστών αντιορών HLA και με κύτταρα γνωστού HLA φαινοτύπου.

Διαδικασία

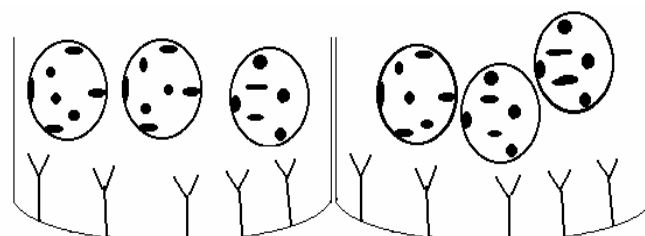
Μετά την απομόνωση των λεμφοκυττάρων το μίγμα των απομονωθέντων κυττάρων διαμοιράζεται με ειδική μικροπιπέττα σε οπές πλάκας terasaki (Εικ. 18.10). Οι πλάκες terasaki μοιάζουν με τις γνωστές πλάκες μικροτιτλοδότησης. **Στον πυθμένα τους περιέχουν προσκολλημένα αντισώματα αντι-HLA.** Κάθε οπή περιέχει 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.



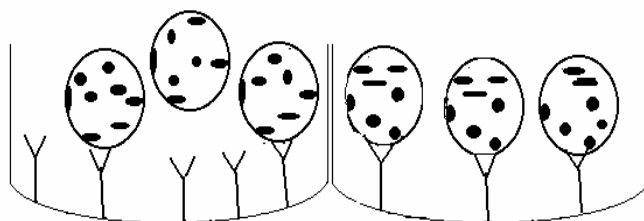
Εικόνα 18.10. Διανομή αντιδραστηρίου με πιπέττα Hamilton

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 (Εικ. 18.11). Η προσκόλληση αυτή θα γίνει εμφανής μόνο όταν τα προσκολλημένα κύτταρα καταστραφούν από συμπλήρωμα που προστίθεται αμέσως μετά.

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 σπάει τις μεμβράνες των προσκολλημένων λεμφοκυττάρων και αφήνει άθικτες τις μεμβράνες των μη προσκολλημένων (Εικ. 18.12). 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.



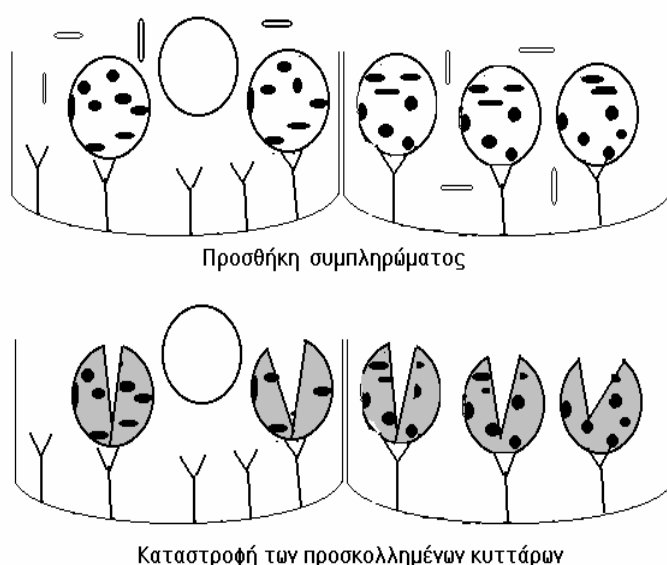
Προσθήκη επιλεγμένης κατηγορίας λεμφοκυττάρων
με πολλά διαφορετικά HLA
αντιγόνα στις οπές της πλάκας terasaki



Ανάλογα με την ειδικότητα των αντισωμάτων anti-HLA
συγκολλούνται λίγα ή πολλά λεμφοκύτταρα πάνω στα τοιχώματα

Εικόνα 18.11

Προσκόλληση λεμφοκυττάρων στον πυθμένα της πλάκας terasaki ανάλογα με την ειδικότητα αντιγόνου HLA και αντισωμάτων anti-HLA



Εικόνα 18.12

Καταστροφή προσκολλημένων λεμφοκυττάρων από την επίδραση συμπληρώματος

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.

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.

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

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.

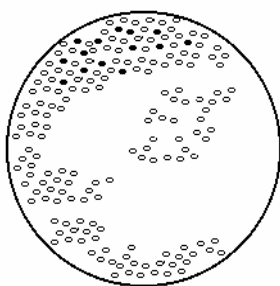
Μικροσκόπηση σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσεως

Εδώ προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι μη φθορίζουσα χρωστική (stain fix).

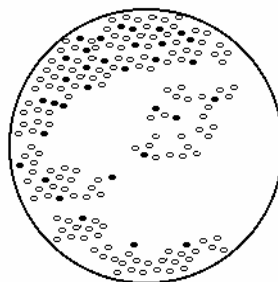
Κατά την μικροσκόπηση παρατηρούμε και εδώ δύο ειδών κύτταρα: νεκρά και ζωντανά. Τα **νεκρά φαίνονται με γεμάτο (σκούρο) πρωτόπλασμα** ενώ τα ζωντανά με διαφανές διαθλαστικό πρωτόπλασμα. Η διάκριση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων απαιτεί μεγάλη εμπειρία και γίνεται πάντα από πολύ εξειδικευμένο προσωπικό (Εικ. 18.13).

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται ως εξής:

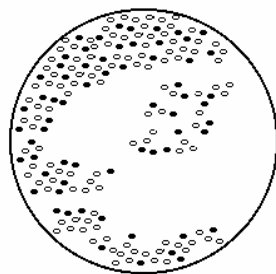
- Νεκρά κύτταρα: 0-10% αρνητικό – βαθμός 1
- 10-20% ασθενής αρνητικό – βαθμός 2
- 20-50% ασθενής θετικό – βαθμός 4
- 50-80% θετικό – βαθμός 6
- 80-100% ισχυρώς θετικό – βαθμός 8



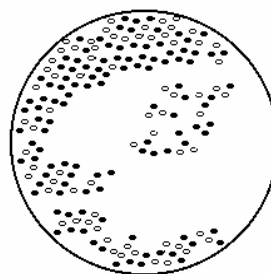
Βαθμός 1: 0-10% νεκρά κύτταρα



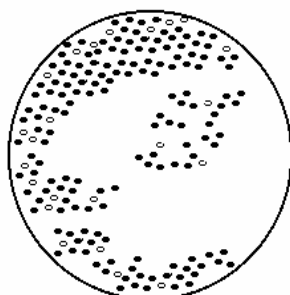
Βαθμός 2: 11-20% νεκρά κύτταρα



Βαθμός 4: 21-50% νεκρά κύτταρα



Βαθμός 6: 51 - 80 % νεκρά κύτταρα



Βαθμός 8: 81 - 100% νεκρά κύτταρα

Εικόνα 18.13.

Οπτικά πεδία μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης για ταυτοποίηση HLA

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 (Εικ. 18.14) και HLA DR, DQ (Εικ. 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.

Στις επόμενες εικόνες (Εικ. 18.14 και Εικ. 18.15) δίνονται δύο υποθετικά παραδείγματα βαθμολόγησης δύο διαφορετικών πλακών terasaki για αντιγόνα HLA A, B, C και HLA DR, DQ.

Έτσι για την πλάκα των HLA A,B,C (Εικ. 18.14) προκύπτουν με σαφήνεια τα ακόλουθα αποτελέσματα A1 (1), A2 (6), A11 (2), A24 (6-8), A25 (1), A26 (6), A29 (4), A30 (1), A31 (2), A32 (1), A33 (6-8), A34(1), B13 (1), B38 (1), B51 (2), B52(1), B62 (8), B63 (2), B78 (8), B81 (4) wk25 (4). Για αρκετά άλλα αντιγόνα δεν μπορεί να βγει σαφές αποτέλεσμα και θα πρέπει να επαναληφθεί ο έλεγχος με νέα πλάκα που θα έχει άλλον συνδυασμό αντιγόνων.

Στην πλάκα των HLA DR, DQ (Εικ. 18.15) τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα ακόλουθα: anti-B (8), anti-T (4), DR1 (8), DR4 (4), DR7 (2), DR8 (1), DR10 (4), DR11 (1), DR12 (1), DR14 (4), DR15 (1), DR16 (1), DR17 (6), DR18 (1), DR1303 (1), DR51 (1), DR52(8), DR53 (1), DQ4 (4), DQ5 (1), DQ6 (1), DQ2 (8). WkDQ5 (1).

HLA A, B, C						
	A	B	C	D	E	F
1	NEG	POS	A1	A1	A1 36	A1 36 80
2	A2	A2	A2 69	A3	A3	A23 24
3	A23	A24	A24 2403	A25 26 34 66 43	A25	A26
4	A26 66	A66 wk11	A34	A11	A11	A68 69
5	A29 43	A29	A29	A30 31	A30	A30
6	A32 wk25	A32	A33	A33	A74 29 31 32 10 43	A74 32 1 3 11 36
7	B51 52	B51	B51 78	B52 49	B7 81 73	B7 42 67 81
8	B7 81	B8	B8	B8 59 wk 65	B64 65	B64 65
9	B64 wk8	B44 45	B44	B44	B45 76	B13
10	B13	B62 63 75 76 77 46 57	B62 63 75 77	B62	B63	B38

ΑΠΑΝΤΗΣΗ						
	A	B	C	D	E	F
1	1	8	1	1	1	6
2	6	6	6	1	1	2-4
3	1	2	2	2	1	6
4	6	2	1	2	2	1
5	4	4	4	2	1	1
6	4	1	6-8	6	4	2
7	2	2	8	2	4	4
8	4	2	2	8	8	8
9	1	1	1	1	6	2
10	2	8	8	8	2	1

Εικόνα 18.14. Πλάκα terasaki για ταυτοποίηση HLA τάξεως I

HLA DR, DQ						
	A	B	C	D	E	F
1	NEG	POS	Anti B	Anti T	DR1	DR1
2	DR1 103 10	DR110 103 9 16 wk15	DR1 16 10 wk9 wk103	DR15 16	DR15 16	DR15
3	DR15	DR17 18	DR17 18	DR17 18	DR13 17 18 11 14	DR4
4	DR4	DR4	DR11	DR11	DR12	DR12
5	DR13 8 12 11	DR13 17 18 11	DR1303 17	DR14	DR14	DR14 0407
6	DR7	DR7	DR7	DR7 12	DR18 wk1301	DR8
7	DR8	DR8	DR8 DQ4	DR9	DR9	DR9
8	DR10	DR10	DR10	DR51	DR52	DR52
9	DR52 8	DR53	DR53	DR53 7	DQ5 DR15	wkDQ5
10	DQ5 6	DQ5 6	DQ5 6 4	DQ4 DR8	DQ2	DQ2

ΑΠΑΝΤΗΣΗ						
	A	B	C	D	E	F
1	1	8	8	4	8	8
2	8	8	8	1	1	1
3	1	6	6	6	8	4
4	4	4	1	1	1	1
5	1	1	1	4	2-4	4
6	2	2	2-4	2	4	1
7	1	1	4	4	4	4
8	4	4	2-4	1	8	8
9	8	1	1	1	1	1
10	1	1	1	2-4	8	6-8

Εικόνα 18.15. Πλάκα terasaki για ταυτοποίηση HLA τάξεως II