

20^o

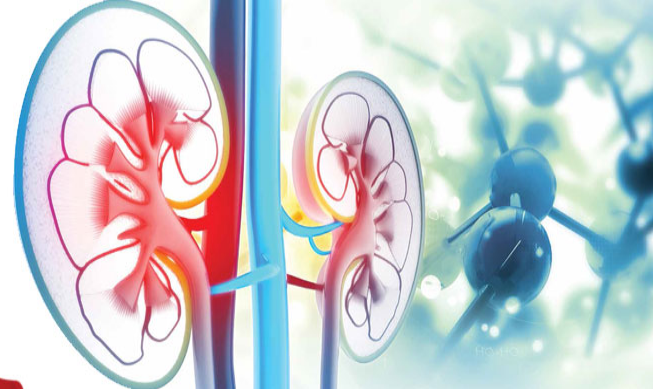
Πανελλήνιο Συνέδριο
Νεφρολογίας

3-6

Μαΐου 2018

Μέγαρο Διεθνές Συνεδριακό
Κέντρο Αθηνών

Αθήνα



www.20psn.gr

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΛΙΓΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ ΝΕΦΡΙΚΟ ΙΣΤΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ

***Κ. Κολοβού¹, Σ. Μαρινάκη¹, Π. Παναγιωτίδης², Μ. Ρουμμελιώτη²,
Π. Σφηκάκης², Ι. Ν. Μπολέτης¹***

***Νεφρολογική Κλινική & Μονάδα
Μεταμόσχευσης Νεφρού,
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, ΓΝΑ Λαϊκό***

***Α' Προπαιδευτική Κλινική & Ειδική
Νοσολογία, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ,
ΓΝΑ Λαϊκό***

Παθογένεια Σπειραματικών Παθήσεων

Μηχανισμοί *χυμικής ανοσίας*
(Antibody mediated immunity)
και δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων
(ΣΕΛ, Μεμβρανώδης, IgA,
Μεταλοιμώδης)

Σπειραματονεφρίτιδες

Μηχανισμοί *κυτταρικής ανοσίας*
(Cell mediated immunity) μέσω
λεμφοκινών από T λεμφοκύτταρα
/ποδοκυτοπάθειες
(FSGS, MCD)

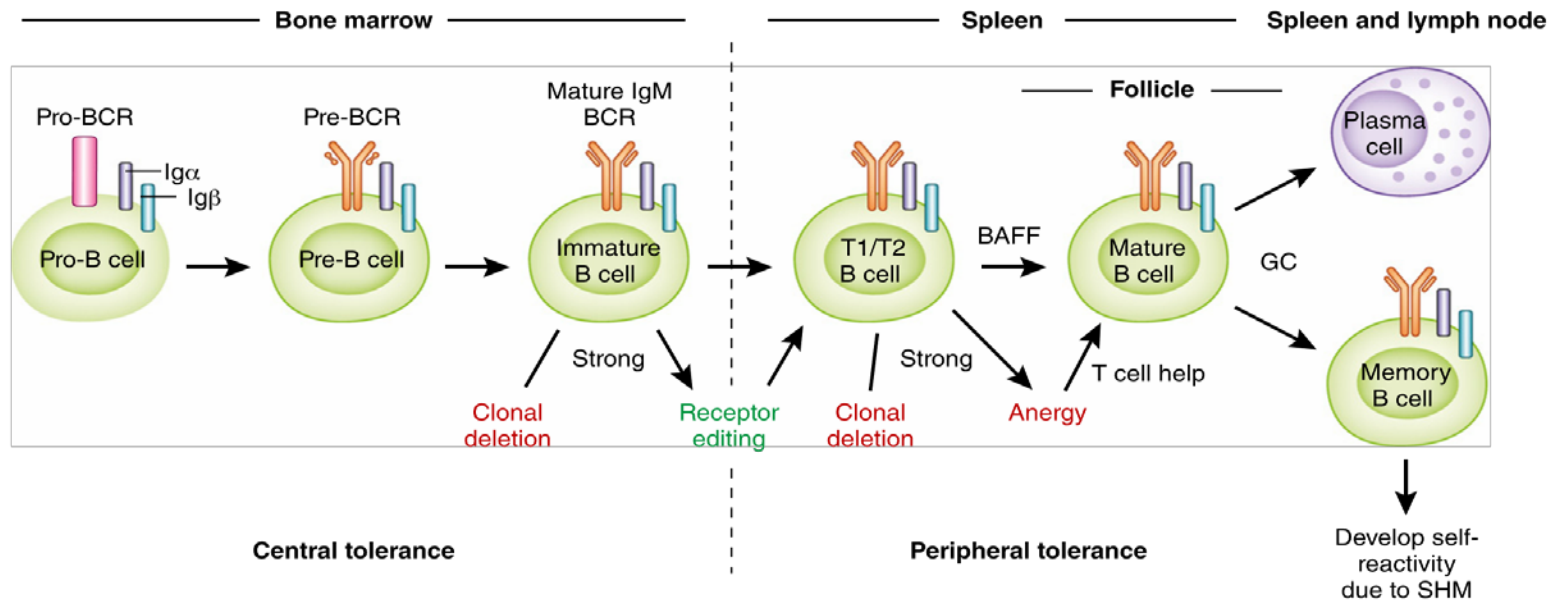
Ποδοκυτοπάθειες

Πιθανή συμμετοχή και των δύο μηχανισμών σε μία νόσο

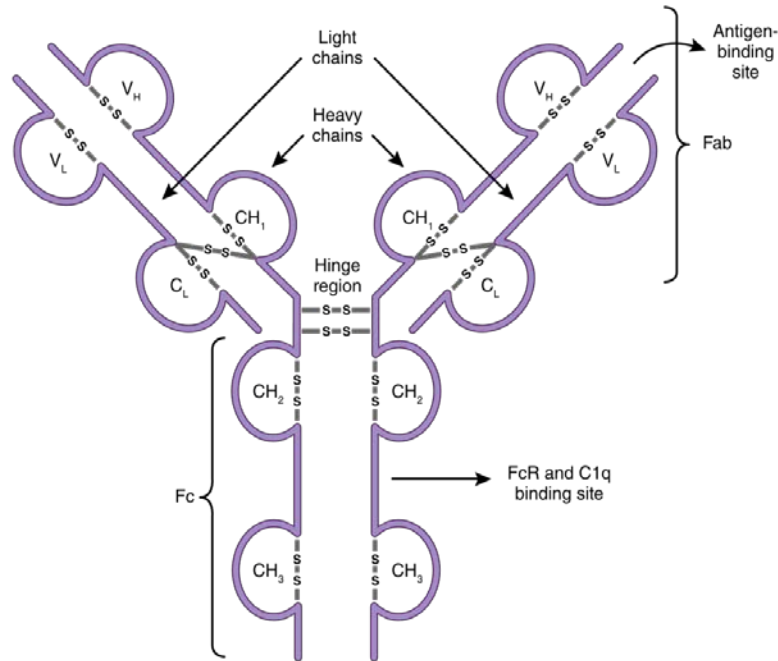
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Ανάπτυξη των Β-λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών

Τα Β λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στο **μυελό των οστών** και στη συνέχεια μετακινούνται στην **περιφέρεια, στα δευτερογενή λεμφικά όργανα**, όπου γίνεται η διαδικασία της διαφοροποίησής τους.



Δομή και λειτουργία των ανοσοσφαιρινών



Οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα είναι γλυκοπρωτείνες που χρησιμεύουν στην αναγνώριση των αντιγόνων.

Κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από **δύο ίδιες ελαφρές αλυσίδες κ ή λ** και **δύο ίδιες βαριές αλυσίδες με 5 ισότυπους** (γ,α,μ,δ και ε) που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς

Η τάξη και η υποτάξη μιας ανοσοσφαιρίνης καθορίζονται από τον τύπο της βαριάς αλυσίδας

Διακρίνουμε 5 τάξεις ανοσοσφαιρινών IgG, IgM, IgA, IgD και IgE

Γενετική των ανοσοσφαιρινών

Ο οργανισμός έχει τη δυνατότητα να παράγει έναν τεράστιο αριθμό ανοσοσφαιρινών ***μοναδικής αντιγονικότητας***

Αυτό οφείλεται στη ***δομή των γονιδίων*** που κωδικοποιούν τη σύνθεσή τους και στην ικανότητα των Β κυττάρων να αναδιατάσσουν αυτά τα γονίδια

Έτσι παράγεται τεράστιος αριθμός ***διαφορετικών αλληλουχιών των μεταβλητών πεδίων***

Ρόλος των Β λεμφοκυττάρων στην παθογένεια της ιστικής βλάβης

Πρόσφατα, όλο και περισσότερες μελέτες επικεντρώνουν στο Β κύτταρο στον νεφρικό ιστό και στον παθογενετικό του ρόλο στην τοπική ιστική βλάβη

Πιθανοί μηχανισμοί για τη συμμετοχή του Β κυττάρου στην τοπική νεφρική βλάβη περιλαμβάνουν μονοπάτια διαφορετικά από την έκκριση ανοσοσφαιρινών όπως:

προαγωγή της χρόνιας φλεγμονής και ίνωση

τοπική αντιγονοπαρουσιαστική δράση

έκτοπη λεμφογένεση

Αυτά ακριβώς τα Β κύτταρα αποτελούν **δύσκολο θεραπευτικό στόχο** στη θεραπεία των αυτοάνοσων νόσων.

ΣΚΟΠΟΣ

Η αναζήτηση της παρουσίας **ολιγοκλωνικών πληθυσμών B- λεμφοκυττάρων** στον νεφρικό ιστό ασθενών με **αυτοάνοσες σπειραματικές παθήσεις** και η συσχέτισή τους με το **είδος** και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της **βλάβης του νεφρικού ιστού** καθώς και με την παρουσία **ολιγοκλωνικών πληθυσμών B λεμφοκυττάρων** στο **αίμα** των ίδιων ασθενών.

Υλικό και μέθοδος

- 42 δείγματα νεφρικού ιστού**
(διαδερμική παρακέντηση δια βελόνης)
- 42 δείγματα αίματος**
(κατά το χρόνο της λήψης του δείγματος)

42 ασθενείς

13 άνδρες

29 γυναίκες

✓ διάμεση ηλικία 37 έτη (εύρος 29 με 56 έτη)

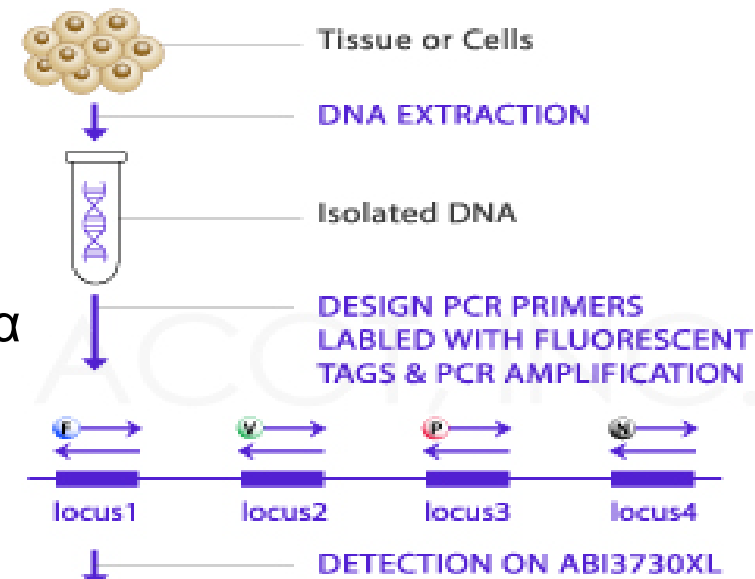
Απομόνωση γενωμικού DNA

➤ Διαχωρισμός του DNA από άλλα κυτταρικά συστατικά και μακρομόρια

➤ Κατάλληλη τεχνική απομόνωσης DNA :

- αρχικό υλικό (κύτταρα, ιστός, αίμα)
- το είδος DNA (χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό)
- την ποιότητα του DNA

➤ Πηγή DNA : λευκά αιμοσφαίρια του αίματος
οποιοδήποτε υλικό περιέχει εμπύρηνες
κύτταρα (βιοψίες ιστού)

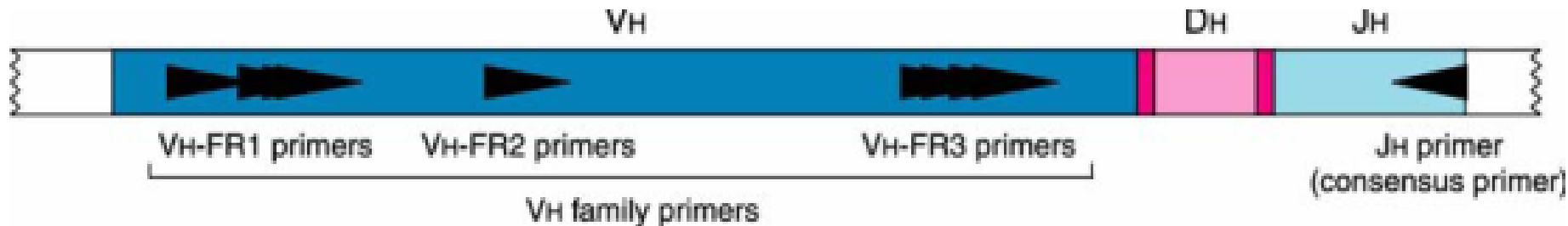


Multiplex PCR

- Ανίχνευση **IGH** κλωνικότητας
- 3 ομάδες εκκινητών ειδικές για την **FR1, FR2 FR3** μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης

- A) FR1: VH1-6+JH consensus (αναμενόμενο μέγεθος PCR προϊόντων 310-360bp)
B) FR2: VH1-7+JH consensus (αναμενόμενο μέγεθος PCR προϊόντων 240-295 bp)
Γ) FR3: VH1-7+JH consensus (αναμενόμενο μέγεθος PCR προϊόντων 100-170 bp)

συνδεδεμένοι με φθοριόχρωμα



- Tube A: 6 V_H-FR1 Primers + J_H Consensus Primer
Tube B: 7 V_H-FR2 Primers + J_H Consensus Primer
Tube C: 7 V_H-FR3 Primers + J_H Consensus Primer

- Ανάλυση προϊόντων της multiplex PCR με τη μέθοδο της **fragment analysis**

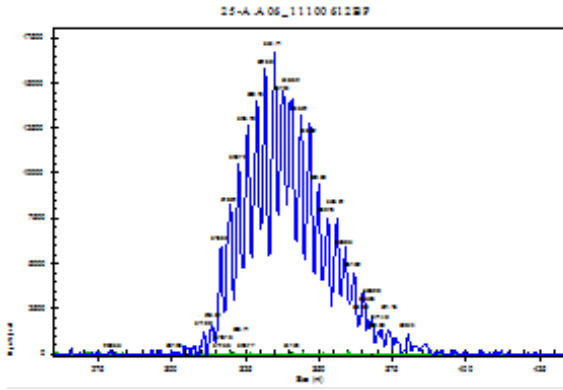
Ανάλυση προϊόντων της multiplex PCR με τη μέθοδο της fragment analysis

Fragments από φυσιολογικό, πολυκλωνικό πληθυσμό κυττάρων
→ **εικόνα κωδωνοειδούς καμπύλης** (κανονική κατανομή κατά Gauss)

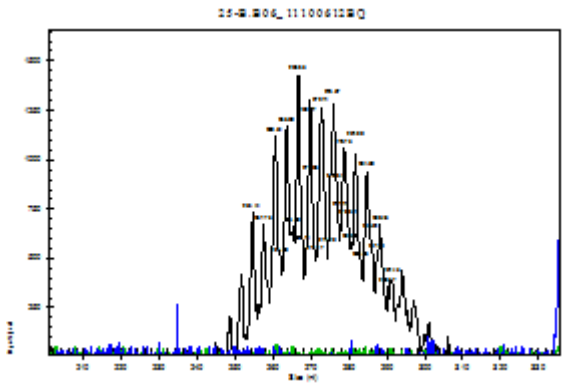
Fragments από ολιγο- ή μονοκλωνικούς πληθυσμούς → εικόνα προεξεχουσών **κορυφών** μέσα σε ένα υπόβαθρο από μικρότερα πολυκλωνικά προϊόντα

Ποσοτικοποίηση του μεγέθους των προϊόντων:
Χαρακτηρισμός της κλωνικότητας → μέγεθος κορυφής > **3 φορές αυτής του υποστρώματος**

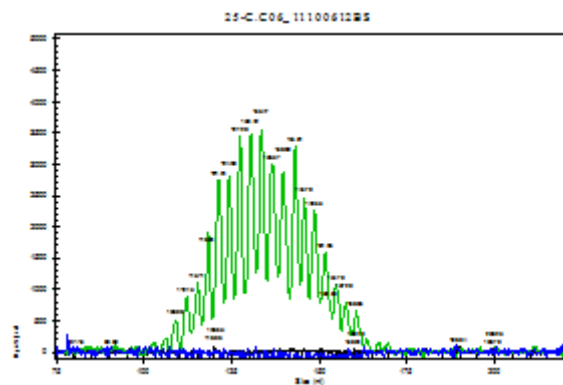
Fragment analysis : πολυκλωνικός πληθυσμός Β λεμφοκυττάρων



FR1, προϊόντα 310-360bp, φθοριόχρωμα μπλε



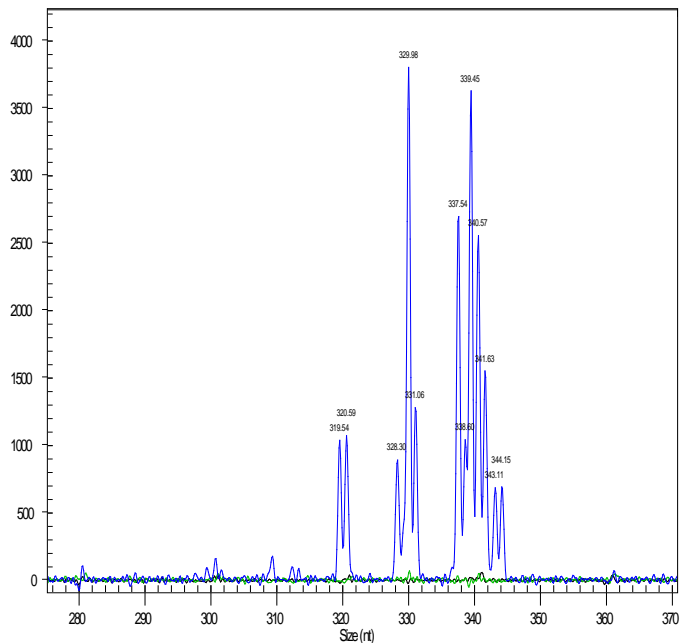
FR2, προϊόντα 240-295bp, φθοριόχρωμα μαύρο



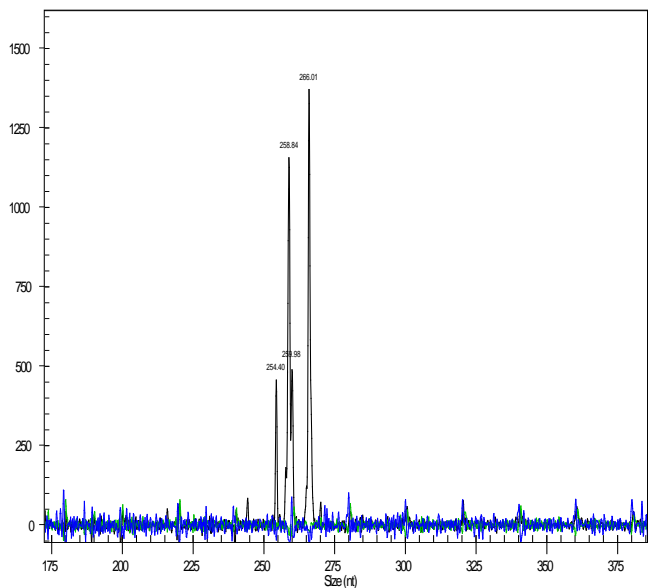
FR3, προϊόντα 100-170bp, φθοριόχρωμα πράσινο

Fragment analysis : ολιγοκλωνικός πληθυσμός Β λεμφοκυττάρων

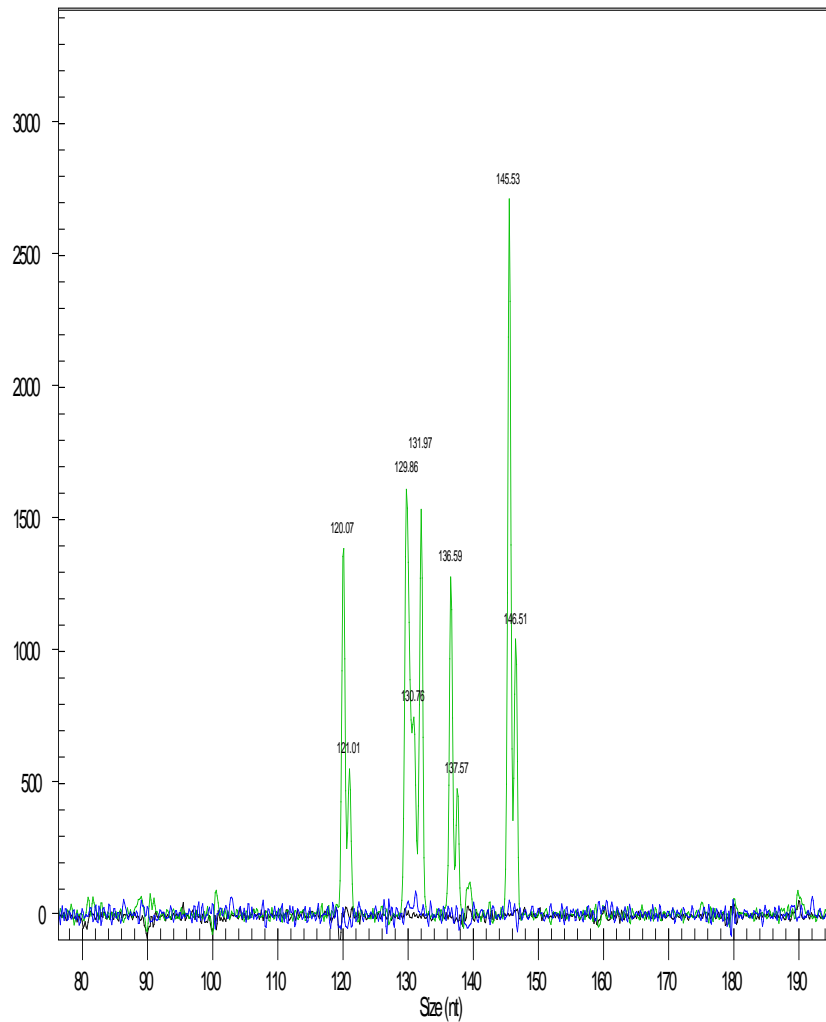
1A.A02_111230140Y



1B.B02_111230140Z



1C.C02_1112301411





ΟΛΙΓΟΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΙΣΤΟ

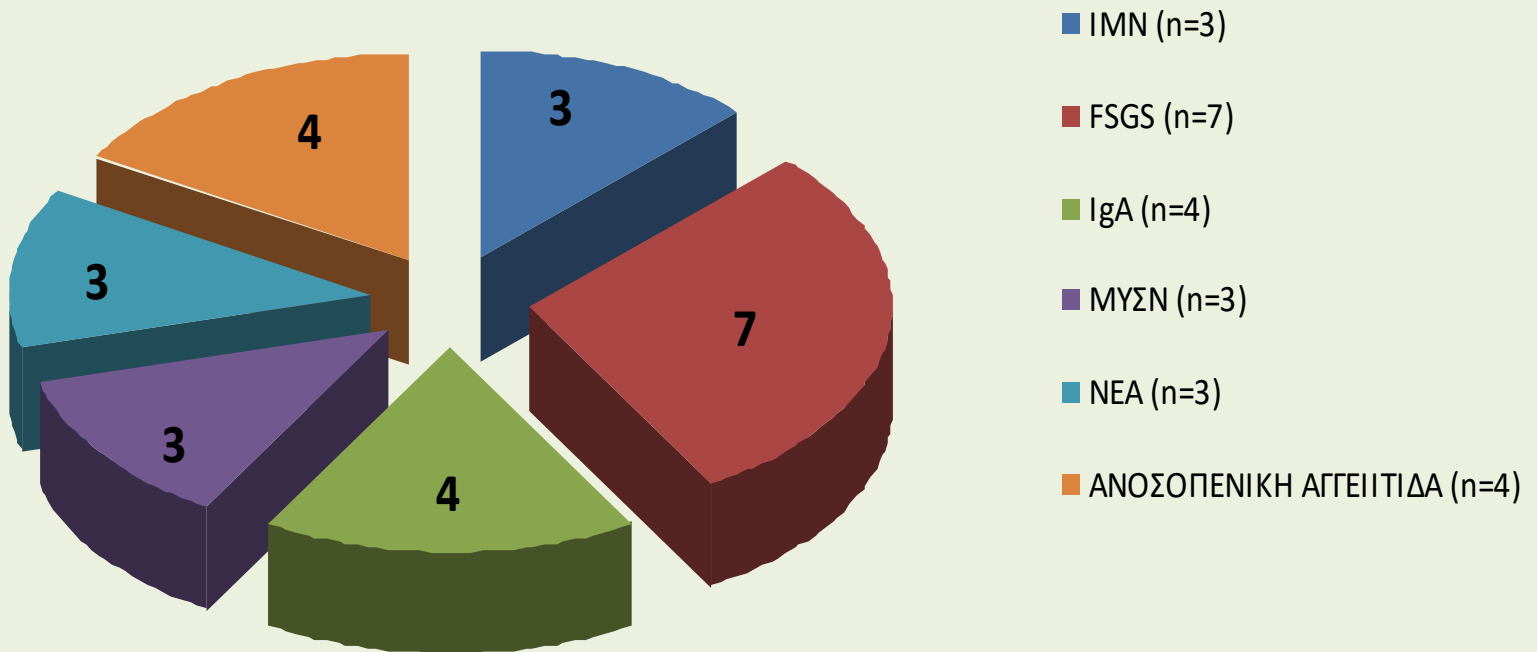
ΟΜΑΔΑ 1: Ασθενείς με ΣΕΛ νεφρίτιδα (**n=18**)

ΟΜΑΔΑ 2: Ασθενείς με αυτοάνοσες σπειραματικές παθήσεις
εκτός του ΣΕΛ (**n=24**)

ΝΕΦΡΙΤΙΔΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟΥ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΟΥΣ ΛΥΚΟΥ

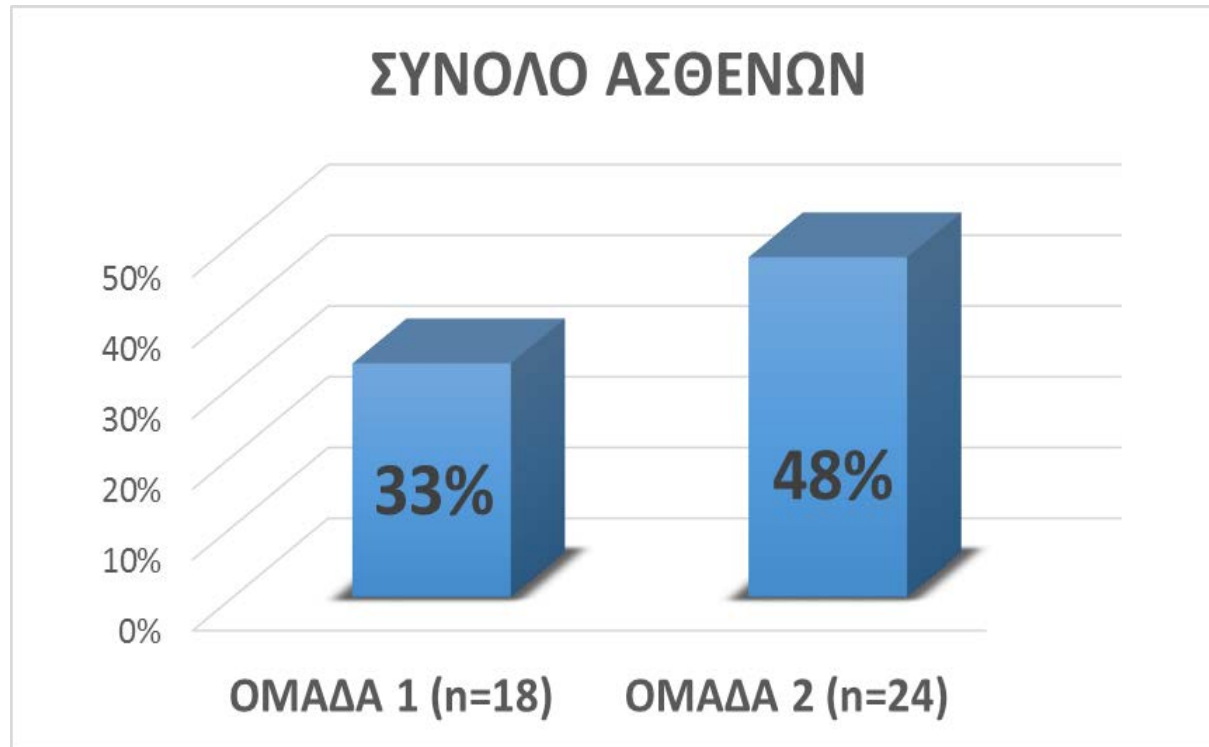
Α/α	ΑΡΧΙΚΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	Τάξη ΣΕΛ νεφρίτιδας	Activity Index	Chronicity Index	Αριθμός σπειραμάτων	Ποσοστό μηνοειδών %	IFTA %	Σπειραματοσκλήρυνση %
1	Π.Α	III	3	6	15	0	10	40
2	Γ.Ν	III	3	6	29	3	25	35
3	Φ.Ν	IV	7	0	45	6,6	0	0
4	Π.Σ	II	-	-	15	0	15	7
5	Ρ.Ζ	V	-	-	22	0	15	0
6	Κ.Σ	V	-	-	22	0	20-25	13
7	Ζ.Γ	V	-	-	11	0	10	0
8	Κ.Δ	II	-	-	8	0	25	38
9	Γ.Β	III	3	3	11	0	15	9
10	Ψ.Μ	V	-	-	18	0	15-20	17
11	Π.Ε	V	-	-	22	0	<10	0
12	Λ.Λ	IV	12	1	13	50	<5	15,38
13	Τ.Ε	III	6	3	18	0	15	11
14	Μ.Σ	IV	8	6	43	14	30-40	28
15	Δ.Ε	IV+V	12	2	10	30	10	15
16	Α.Μ	II	-	-	23	0	0	0
17	Κ.Χ	IV	11	3	8	50	15	0
18	Ε.Μ	IV	7	5	42	14	20	24

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ



ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

ΟΛΙΓΟΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΙΣΤΟ



Από τους **18 της ομάδας 1**, οι **6 (33%)** είχαν παρουσία ολιγοκλωνικών πληθυσμών Β κυττάρων στο νεφρικό ιστό, συγκριτικά με **11 από τους 24 (48%) της ομάδας 2**

ΟΛΙΓΟΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΙΣΤΟ

Ασθενείς με ΣΕΛ νεφρίτιδα

Ολιγοκλωνικοί πληθυσμοί Β κυττάρων στο νεφρικό ιστό ανευρέθηκαν σε 6 από τους 18 ασθενείς (33%).

Όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ομάδες, ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία ολιγοκλωνικότητας, η ανεύρεση ολιγοκλωνικών πληθυσμών Β-κυττάρων στον ιστό δεν φάνηκε να σχετίζεται ούτε με την τάξη της νεφρίτιδας του ΣΕΛ ούτε με την ιστολογική ενεργότητα ή χρονιότητα της νόσου.

ΟΛΙΓΟΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΙΣΤΟ

Ασθενείς με άλλες αυτοάνοσες σπειραματικές παθήσεις

Ιδιοπαθείς ΣΠ

IgA
FSGS
NEA
MN
ΜΥΣΝ τύπου I

Δευτεροπαθείς ΣΝ

Ανοσοπενικές αγγειίτιδες

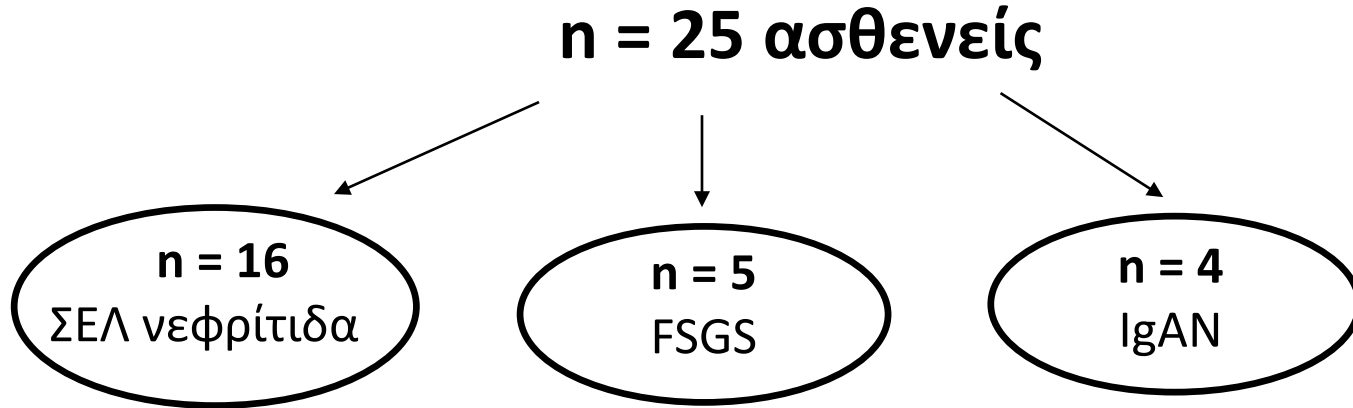
*Σε καμία από τις συγκρίσεις των υποομάδων δεν φάνηκαν **διαφορές** στα ποσοστά ολιγοκλωνικότητας.*

Σπειραματονεφρίτιδες
Ανοσοπενικές αγγειίτιδες
IgA
ΜΥΣΝ I

Ποδοκυτοπάθειες

NEA
FSGS
MN

ΟΛΙΓΟΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ



Σε κανέναν από τους ασθενείς δεν ανιχνεύθηκαν ολιγοκλωνικοί πληθυσμοί στο περιφερικό αίμα,

σε αντίθεση με τον ιστό, όπου ανευρέθηκαν κλωνικές εκπτώξεις B κυττάρων στο 38%.

ΟΛΙΓΟΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

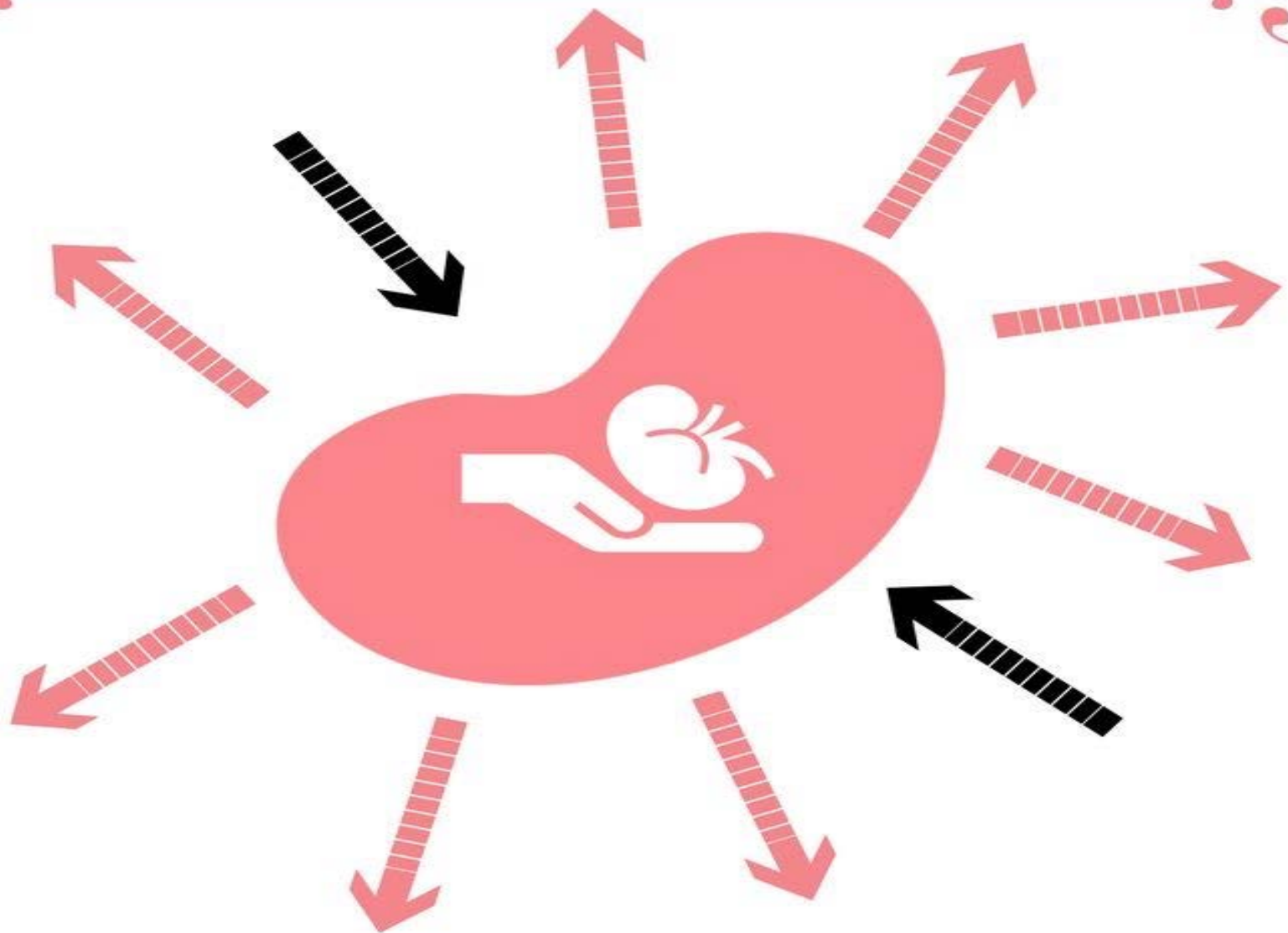
Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί υπό το πρίσμα των ολοένα αυξανόμενων δεδομένων για τον κεντρικό ρόλο **κλώνων αυτοδραστικών Β κυττάρων** που συμμετέχουν στη **δημιουργία και τη συντήρηση της τοπικής ανοσολογικής βλάβης** στον νεφρικό ιστό.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι **ολιγοκλωνικοί πληθυσμοί Β-κυττάρων** μπορεί να ανιχνευθούν σε υψηλό ποσοστό σε ασθενείς με ενεργό ΣΕΛ νεφρίτιδα.

Παρότι το εύρημα **δεν είναι ειδικό της ΣΕΛ νεφρίτιδας** και κατά συνέπεια δεν μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης, θα μπορούσε να βοηθήσει στην **ταυτοποίηση ασθενών με σπειραματικές παθήσεις ανοσολογικής αιτιολογίας** που θα είχαν ενδεχόμενο όφελος από θεραπείες εξάλειψης των Β λεμφοκυττάρων.

Μελλοντικό πεδίο έρευνας αποτελούν μελέτες που θα στοχεύουν στην ακριβή εντόπιση συγκεκριμένων VΗ αλληλουχιών των κλωνικών Β-κυττάρων που θα συνδέουν συγκεκριμένα, τοπικά εκφραζόμενα (αυτο)αντιγόνα.



**WOMEN ARE MORE LIKELY TO
DONATE A KIDNEY AND LESS LIKELY
TO RECEIVE ONE**

