



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη επιπέδων ανοσοσφαιρινών και υποτάξεων τους και ανίχνευσης
πολυμορφισμών του γονιδίου *TACI* σε ασθενείς με αυτοάνοσες κυτταροπενίες**

Λούτσου Μαρία

Ιατρός

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Γιαννακούλας Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας (Επιβλέπων)
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων,
Διευθυντής του ΠΜΣ «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού
Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ανοσολογία

Λάρισα, Φεβρουάριος 2024



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN
«CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE»**

MASTER THESIS

**Measurement of immunoglobulins and their subclasses and detection of *TACI*
gene polymorphisms in patients with autoimmune cytopenias**

Loutsou Maria

Doctor

Examination Committee:

- Giannakoulas Nikolaos, Associate Professor of Hematology (Supervisor)
- Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases,
Director of Master Program «Clinical Applications of Molecular Medicine»

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for Master in Molecular Immunology

Larissa, February 2024

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT.....	7
ΓΕΝΙΚΑ	9
1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΠΕΝΙΕΣ.....	9
1.1 ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΑ.....	10
1.2 ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ	18
1.3 ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ.....	20
1.4 ΣΥΝΔΡΟΜΟ EVANS	21
2. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ.....	22
2.1 ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΟΙΝΗΣ ΠΟΙΚΙΛΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ.....	23
2.2 ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ ΥΠΟΤΑΞΕΩΝ ΤΗΣ IgG ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....	23
2.3 Η ΣΧΕΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΤΑΞΕΩΝ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΠΕΝΙΕΣ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	26
3. Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ TACI.....	29
3.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ TACI.....	29
3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ TACI ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΤΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	30
3.3 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>TNFRSF13B/TACI</i>	33
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	37
1. ΣΚΟΠΟΣ.....	37
2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	37
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ	38
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	39
3.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>TNFRSF13B/TACI</i>	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023 υπό την επίβλεψη του κ. Γιαννακούλα Νικόλαου Επίκουρου Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας του τμήματος Ιατρικής Π.Θ. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Γιαννακούλα για τη συνεχή στήριξη στη διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης αλλά και για τη σημαντική συνεισφορά του στη συλλογή των δειγμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Σπελέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελώ μέλος της ερευνητικής του ομάδας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Σπελέτα για τη συνεχή καθοδήγηση και στήριξη, καθώς το γραφείο του ήταν και είναι πάντα ανοιχτό για ερωτήσεις και συμβουλές.

Θα ήθελα να εκφράσω θερμές μου ευχαριστίες στην κα Καλαλά, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας για τη συνεχή εκπαιδευτική στήριξη και βοήθεια, αλλά και για τις συμβουλές της.

Οφείλω να ευχαριστήσω τα κέντρα που βοήθησαν στην συλλογή των δειγμάτων. Αρχικά, την Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, αλλά και την Αιματολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Παπαγεωργίου και ιδιαίτερα την κα Κιουμή Άννα (Διευθύντρια Αιματολογικού) καθώς και τους παιδιατρους από το Παιδοαιματολογικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ και ιδιαίτερα τον κ. Χατζηπαντελή Καθηγητή Παιδιατρικής-Παιδιατρικής Αιματολογίας & Ογκολογίας Α.Π.Θ και την κα Αντάρη Βασιλική.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας για τη συνεχή βοήθεια στη συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων. Επιπρόσθετα, θα ήθελα ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου για την αλληλοβοήθεια και την συνεχή συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την στήριξη και την συμπαράστασή τους.

*«Έπιστήμη ποιητική εὐδαιμονίας»
Πλάτων*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες αποτελούν μία ομάδα διαταραχών που χαρακτηρίζονται από καταστροφή των αιμοποιητικών κυττάρων μέσω ανοσολογικού μηχανισμού. Στο 70% είναι πρωτοπαθείς, ενώ οι υπόλοιπες περιπτώσεις είναι δευτεροπαθείς και συνδέονται με υποκείμενα νοσήματα όπως αυτοάνοσα, κακοήθειες (κυρίως λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα), ανοσοανεπάρκειες, λοιμώξεις και φάρμακα. Είναι γνωστό ότι 20% των ασθενών με Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (ΚΠΑ) εμφανίζουν αυτοάνοσες κυτταροπενίες (πιο συχνή η Ιδιοπαθή Θρομβοπενική Πορφύρα- ΙΑΘ), ενώ 1% ασθενών με ΙΑΘ μπορεί να εμφανίσει είτε ΚΠΑ είτε IgA ανεπάρκεια. Οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες αποτελούν την πιο συχνή αυτοάνοση εκδήλωση ασθενών με ΚΠΑ και μπορεί η εμφάνισή τους να προηγείται ακόμα και έτη πριν την εκδήλωση της νόσου.

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι, ασθενείς με αυτοάνοσο αιματολογικό νόσημα παρουσιάζουν χαμηλές τιμές της ανοσοσφαιρίνης IgG4, χωρίς εμφανή υπογαμμασφαιριναιμία καθώς και ασθενείς με εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG4 εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TACI/TNFRSF13B* σε υψηλό ποσοστό. Με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα, σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων σε ασθενείς με αυτοάνοσες κυτταροπενίες και η περαιτέρω γενετική ανάλυση του γονιδίου *TACI/TNFRSF13B*.

Αναλύσαμε ασθενείς με αιματολογική αυτοανοσία και ελέγξαμε τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων τους στον ορό και έπειτα σε περιπτώσεις όπου βρήκαμε ανεπάρκεια υποτάξεων (IgG4), προχωρήσαμε σε αλληλούχιση του γονιδίου *TACI/TNFRSF13B* με τη μέθοδο Sanger.

Συνολικά, μελετήσαμε 116 ασθενείς (106 ενήλικες, Γ/Α= 60/48 και 8 παιδιά, Α/Κ=4/4). Στους 76 ασθενείς μετρήσαμε υποτάξεις ανοσοσφαιρινών ορού. Σε 8/76 (10,5%) ανιχνεύσαμε εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG4. Σε έναν ασθενή ανιχνεύσαμε τη μετάλλαξη A181E σε ετεροζυγωτία και σε 7 από τους 8 ασθενείς ανιχνεύσαμε τους πολυμορφισμούς T27 (rs8072293), S277 (rs11078355), P251L (rs34562254), A24625C (rs2274893) και A24625C (rs2274892) του *TACI/TNFRSF13B* που δεν αιτιολογούν ανοσοανεπάρκεια.

Διαπιστώσαμε ότι σημαντικό ποσοστό ασθενών με αυτοάνοσες κυτταροπενίες έχει εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG4. Συνεπώς, η IgG4 θα μπορούσε να αποτελέσει βιοδείκτη για την καλύτερη εκτίμηση και παρακολούθηση ασθενών με αυτοάνοσες κυτταροπενίες.

Λέξεις- Κλειδιά:

Αυτοάνοσες κυτταροπενίες

Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες

Εκλεκτική ανεπάρκεια υποτάξεων IgG

IgG4 ανοσοσφαιρίνη

Γονίδιο *TACI/TNFRSF13B*

ABSTRACT

Autoimmune cytopenias are a group of disorders characterized by destruction of hematopoietic cells through immune mechanism. In 70% of cases are primary and the others are secondary, associated with underlying diseases such as autoimmunity, malignancies (mainly lymphoproliferative disorders), immunodeficiencies, infections, and medications. It is known that approximately 20% of patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID) suffer from autoimmune cytopenias (most common from Idiopathic Thrombocytopenic Purpura - ITP). On the other hand, 1% of patient with ITP can manifest CVID or selective IgA deficiency (sIgA) during their life. Autoimmune cytopenias make up the most common autoimmune manifestation of CVID. The presence of ITP can be preceded many years prior to CVID diagnosis.

Previous studies of our research lab showed that, patients with autoimmune cytopenias have low levels of IgG4 immunoglobulin, without evident hypogammaglobulinemia. Moreover, a rather high frequency of *TACI/TNFRSF13B* defects was identified in patients with selective IgG4 deficiency (sIgG4D). Considering all the above, the aim of this study was to investigate the levels of immunoglobulins and their subclasses in patients with autoimmune cytopenias and to proceed to the genetic analysis of *TACI/TNFRSF13B* gene.

We analyzed the levels of immunoglobulins and their subclasses and in cases of sIgG4D, we proceeded to genetic analysis of *TACI/TNFRSF13B* gene with Sanger method.

In total, we investigated 116 patients (106 adults F/M=60/48 and 8 children B/G=4/4). In 76 of them, we measured the levels of IgG subclasses. We detected sIgG4D in 8/76 (10,5%). One patient was heterozygous in the common A181E mutation. The common polymorphisms T27 (rs8072293), S277 (rs11078355), P251L (rs34562254), A24625C (rs2274893) και A24625C (rs2274892) were identified in 7/8 patients with sIgG4D. These polymorphisms are not associated with immunodeficiency.

Our data provide evidence that, a rather high frequency of patients with autoimmune cytopenias have sIgG4D. Hence, the immunoglobulin IgG4 could be made used of an important biomarker for the optimal evaluation and follow up of patients with autoimmune cytopenias.

Key-words

Autoimmune cytopenias

Primary Antibodies Deficiency (PAD)

Selective IgG subclasses deficiency

IgG4 immunoglobulin

TACI/TNFRSF13B gene

ΓΕΝΙΚΑ

1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΠΕΝΙΕΣ

Οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες αποτελούν μία ομάδα διαταραχών, που χαρακτηρίζονται από καταστροφή των αιμοποιητικών κυττάρων μέσω ανοσολογικού μηχανισμού [1]. Η νόσος οφείλεται σε παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι, είτε μεμονωμένα μιας αιμοποιητικής σειράς κυττάρων όπως των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία), των ουδετεροφίλων (αυτοάνοση ουδετεροπενία), των αιμοπεταλίων (αυτοάνοση θρομβοπενία), είτε συνδυασμού (δύο ή όλων) των παραπάνω αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών (σύνδρομο Evans) [1][2].

Οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες μπορεί να είναι πρωτοπαθείς (ιδιοπαθείς) ή δευτεροπαθείς. Οι πρωτοπαθείς είναι συχνότερες και αφορούν το 70% των ασθενών με αυτοάνοσες κυτταροπενίες, με πιο συχνή την αυτοάνοση θρομβοπενία, ενώ δεύτερη σε συχνότητα είναι η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία. Οι δευτεροπαθείς αυτοάνοσες κυτταροπενίες συνδέονται με υποκείμενα νοσήματα όπως συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα, κακοήθειες (κυρίως λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα), ανοσοανεπάρκειες, λοιμώξεις και φάρμακα [2]. Εκδηλώνονται σε όλες τις ηλικίες (και στην παιδική), ενώ το εύρος των κλινικών τους εκδηλώσεων είναι μεγάλο [3]. Στο 25% περίπου των περιπτώσεων η νόσος είναι ασυμπτωματική και η διάγνωση μπορεί να γίνει σε τυχαίο αιματολογικό έλεγχο. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις μπορεί να υπάρχει μεγάλου βαθμού καταστροφή και μείωση των κυττάρων του αίματος και η νόσος να συνοδεύεται από σοβαρές επιπλοκές (αιμορραγία επί θρομβοπενίας, σοβαρή αναιμία επί αιμόλυσης και λοιμώξεις λόγω ουδετεροπενίας) [4].

Κεντρικό ρόλο στη παθογένεια των αυτοάνοσων κυτταροπενιών διαδραματίζει η αποτυχία της κεντρικής και περιφερικής ανοχής. Με τον όρο «ανοχή» εννοείται η προστασία του οργανισμού από αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα, η αποτυχία της οποίας οδηγεί σε ανοσιακές αποκρίσεις έναντι ιδίων αντιγόνων και στην προκειμένη περίπτωση, έναντι γλυκοπρωτεϊνών της επιφάνειας των κυττάρων του αίματος. Η περιφερική ανοχή επάγεται από CD8 T-καστασταλτικά, και (κυρίως) από T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (T regulatory cells Treg), τα οποία αποτελούν υποπληθυσμό των CD4+ T βοηθητικών κυττάρων εκφράζοντας υψηλά

επίπεδα CD25 (υποδοχέα της IL-2). Η περιφερική ανοχή έχει ως στόχο τη διατήρηση της ανεργίας, καταστέλλοντας ανοσιακές απαντήσεις που επάγονται από αυτοαντιγόνα [5]. Παθογενετικοί μηχανισμοί όπως η μοριακή μίμηση (ιογενείς λοιμώξεις, μυκόπλασμα), η παραγωγή νεοαντιγόνων από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως φάρμακα και η διαταραχή της ανοσορύθμισης, έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση αυτοανοσίας και την εκδήλωση αυτοάνοσων κυτταροπενιών. Όσον αφορά τη συμμετοχή της χυμικής ανοσίας, αυτή χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων από B-αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα και καταστροφή των κυττάρων έναντι των οποίων στρέφονται τα αυτοαντισώματα, από τα μακροφάγα στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (σπλήνα, ήπαρ) [6][7].

1.1 ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΑ

1.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ιδιοπαθής αυτοάνοση θρομβοπενία (ΙΑΘ) είναι μια καλοήθης αιματολογική νόσος που χαρακτηρίζεται από καταστροφή των αιμοπεταλίων είτε από αυτοαντισώματα ή πιο σπάνια από T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, είτε από καταστολή της μεγακαρυοποίησης στο μυελό των οστών και ποικίλης βαρύτητας θρομβοπενία με αιμορραγικές εκδηλώσεις. Ως θρομβοπενία ορίζεται η τιμή των αιμοπεταλίων $PLT < 100 \times 10^3 / \mu L$ με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές αίματος να είναι φυσιολογικές. Η νόσος ταξινομείται ανάλογα με τη διάρκεια της θρομβοπενίας και την ανθεκτικότητα στη θεραπεία σε νεοδιαγνωσμένη <3 μήνες, σε εμμένουσα 3-12 μήνες και σε χρόνια >12 μήνες. Συμπτώματα όπως, πορφυρικό εξάνθημα, αιματώματα, επίσταξη και αιμορραγικές εκδηλώσεις από τους βλενογόννους, θέτουν την υποψία της ΙΑΘ. Ωστόσο, ένα 25% ποσοστό των ασθενών είναι πλήρως ασυμπτωματικοί με ανεύρεση θρομβοπενίας σε τυχαίο έλεγχο. Η νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1735 από το Γερμανό ιατρό Paul Gottlieb Werlhof [8]. Το 1916 αναφέρεται η πρώτη επιτυχής σπληνεκτομή ασθενούς με ΙΑΘ και έκτοτε η σπληνεκτομή αποτελούσε πρώτη γραμμή θεραπείας [9]. Το 1951 οι William J Harrington και James W Hollingsworth αναφέρουν ότι η καταστροφή των αιμοπεταλίων είναι ανοσολογικής αρχής και οφείλεται σε παράγοντες του πλάσματος που στρέφονται εναντίον των αιμοπεταλίων [10]. Οι ανακαλύψεις αυτές αποτέλεσαν τα θεμέλια της κατανόησης της νόσου. Ο όρος

ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα αντικαταστάθηκε πρόσφατα με τον όρο ιδιοπαθής αυτοάνοση θρομβοπενία, καθώς πολλοί ασθενείς δεν εμφανίζουν πορφύρα και κατά πλειονότητα αποτελεί αυτοάνοση διαταραχή [11].

1.1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η αυτοάνοση θρομβοπενία (ΙΑΘ) διακρίνεται σε ιδιοπαθής και δευτεροπαθής. Η ιδιοπαθής ΙΑΘ εμφανίζεται στο 80% των περιπτώσεων και δεν σχετίζεται με άλλα νοσήματα. Στο υπόλοιπο 20% των περιπτώσεων η ΙΑΘ είναι δευτεροπαθής και εμφανίζεται στα πλαίσια αυτοάνοσων νοσημάτων, κακοηθειών, λοιμώξεων και φαρμάκων. Η ετήσια επίπτωση της ΙΑΘ υπολογίζεται σε 2-6 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό ανά έτος και αυξάνεται με την ηλικία, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 56 έτη [12]. Στα παιδιά αποτελεί την πιο συχνή αιματολογική διαταραχή με καλοήγη αυτοπεριοριζόμενη πορεία με εξαιρετική πρόγνωση, εποχιακή κατανομή και η επίπτωση κυμαίνεται σε 1,9-6,4 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό ανά έτος [13][14]. Στους ενήλικες η νόσος είναι συχνά χρόνια, με ασαφή έναρξη και συχνότερη εμφάνιση σε γυναίκες ηλικίας 30-60 ετών με αναλογία Γ/Α= 2/1 [13]. Πάνω από 20% ασθενών με ΙΑΘ εμφανίζουν και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως ΣΕΛ, θυρεοειδίτιδα Hashimoto ή πάσχουν από χρόνιες λοιμώξεις [14]. Οι μελέτες δείχνουν ότι οι ασθενείς με ΙΑΘ έχουν 30% μεγαλύτερη νοσηρότητα και θνητότητα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [13]. Σε μία μελέτη με 152 ασθενείς με ΙΑΘ, αυτοί με σταθερά χαμηλά αιμοπετάλια $<30 \times 10^9/L$ είχαν 4 φορές υψηλότερο κίνδυνο θανάτου από αυτούς χωρίς βαριά θρομβοπενία. Στην ίδια μελέτη το μεγάλο ποσοστό (85%) των ασθενών με αιμοπετάλια $>30 \times 10^9/L$, σε δύο έτη μετά τη διάγνωση εμφάνισε θνητότητα ανάλογη του γενικού πληθυσμού [15]. Σε μία άλλη μελέτη που συμμετείχαν 423 παιδιά με ΙΑΘ, μετά από 6 μήνες παρακολούθηση στο 97% αυτών διαπιστώθηκαν αιμορραγικές εκδηλώσεις μόνο ήπιας ή μέσης βαρύτητας και κανένας θάνατος. Στα παιδιά, ο κίνδυνος ενδοκράνιας αιμορραγίας είναι μικρότερος από 1% και η θνητότητα υπολογίζεται στο 1% με κύρια αίτια τη σηψαιμία μετά από σπληνεκτομή [16].

1.1.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Μέχρι πρότινος η αυτοάνοση καταστροφή των αιμοπεταλίων (μέσω αυτοαντισωμάτων και Τ κυτταροτοξικών κυττάρων) θεωρείτο ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης της θρομβοπενίας. Νεότερα δεδομένα έδειξαν ότι σε ασθενείς με ΙΑΘ καταστέλλεται η φυσιολογική μεγακαρυοποίηση, σαν επιπρόσθετος μηχανισμός θρομβοπενίας. Οι κύριοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη παθογένεια της νόσου συνοπτικά είναι 1) η παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι γλυκοπρωτεϊνών της επιφάνειας των αιμοπεταλίων 2) η παρουσία Τ κυτταροτοξικών κλώνων που στρέφονται ενάντια των αιμοπεταλίων στην περιφέρεια αλλά και έναντι μεγακαρυοκυττάρων στο ΜΟ 3) η σχετική ανεπάρκεια της ΤΡΟ (θρομβοποιητίνης) 4) η μη φυσιολογική μεγακαρυοποίηση.

1) ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Το 1951 ο W. Harrington στην προσπάθεια του να κατανοήσει το μηχανισμό καταστροφής των αιμοπεταλίων, πραγματοποίησε πειράματα στα οποία μετά από μετάγγιση του ίδιου με αίμα ασθενών με ΙΑΘ εκδήλωσε βαριά θρομβοπενία. Έπειτα, η άνοδος του αριθμού των αιμοπεταλίων μετά από σπληνεκτομή έδειξε ότι ο σπλήνας αποτελούσε το σημείο καταστροφής των ΑΜΠ. Για πρώτη φορά θεμελιώνεται η θεωρία ότι ο αντι-αιμοπεταλιακός παράγοντας του πλάσματος που ανήκει στο κλάσμα της IgG είναι αυτοαντίσωμα και καταστρέφει τα αιμοπετάλια με ανοσολογικό μηχανισμό στο σπλήνα. Πρόκειται για αντι-αιμοπεταλιακά αντισώματα έναντι γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης των ΑΜΠ, (Glycoproteins, GP IIb/IIIa, GPIb/IX, GPIa/IIa, GPIV, GPV) που αποτελούν εκλυτικά αντιγόνα στους ασθενείς με ΙΑΘ [17][18][19][20]. Τα αυτοαντισώματα προσδένονται στη μεμβράνη των ΑΜΠ (οψωνινοποίηση) και καταστρέφονται στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα του σπληνός [21]. Υπάρχει και άλλη θεωρία που υποστηρίζει ότι η καταστροφή γίνεται και μέσω ενεργοποίησης της κλασσικής οδού του συμπληρώματος καθώς σε πειράματα με πρόσδεση του C3 σε φυσιολογικά αιμοπετάλια και επώαση με αντισώματα από ορό πασχόντων οδήγησαν σε λύση των ΑΜΠ [22].

Κεντρικό ρόλο στην παθογένεια διαδραματίζει η αποτυχία της κεντρικής και περιφερικής ανοχής, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων έναντι εαυτών αντιγόνων. Παρατηρείται πολυκλωνική παραγωγή αντισωμάτων έναντι πολλαπλών επιτόπων των ΑΜΠ. Καθώς τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τα αιμοπετάλια, αποικοδομώντας τις γλυκοπρωτεΐνες,

σχηματίζουν νέα παράγωγα αυτών που λειτουργούν ως νεοπίτοποι. Γνωρίζοντας την ιδιότητα των μακροφάγων ως επαγγελματικά αντιγίνοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC), παρουσιάζουν πρωτεϊνικά νεοαντιγόνα μέσω του μορίου MHC τάξης II σε CD4 Th κύτταρα που οδηγούν στην περαιτέρω πολυκλωνική επέκταση των B κυττάρων και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων [23]. Μελέτες επώασης μεγακαρυοκυττάρων με πλάσμα πασχόντων με ΙΑΘ έδειξαν καταστολή και παρεμπόδιση της φυσιολογικής μεγακαρυοκυτταρικής ανάπτυξης και ωρίμανσης *in vitro* [24].

1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ΙΑΘ θεωρείται παραδοσιακά μια νόσος διαμεσολαβούμενη από αυτοαντίσωμα (antibody-mediated disease). Ωστόσο, τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T κύτταρα ενοχοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην παθογένεια της ΙΑΘ το 2003, όπου πραγματοποιήθηκαν *in vivo* πειράματα σε ποντίκια που απέδειξαν τη συμμετοχή τους στην παθογένεια της νόσου [25]. Το γεγονός ότι σε ποσοστό 40% των ασθενών τα αυτοαντισώματα δεν είναι ανιχνεύσιμα και στο 30% ασθενών με σπληνεκτομή η θρομβοπενία επιμένει, υποδεικνύει και άλλους μηχανισμούς καταστροφής των ΑΜΠ. Επίσης, το γεγονός ότι τα αυτοαντισώματα που ανιχνεύονται στον ορό ασθενών με ΙΑΘ, έχουν υποστεί και ισοτυπική μεταστροφή και σωματικές υπερμεταλλάξεις υποδεικνύει τη συμμετοχή των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Σε σημαντικό ποσοστό ασθενών, ανιχνεύονται αυτοδραστικά CD4⁺ T κύτταρα με ειδικότητα έναντι των γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης των ΑΜΠ. Επίσης, σε πειράματα με επώαση φυσιολογικών ΑΜΠ με κυτταροτοξικά T κύτταρα ασθενών, διαπιστώθηκε λύση αυτών μέσω άμεσης κυτταροτοξικότητας. Γνωρίζοντας ότι τα ρυθμιστικά T κύτταρα καταστέλλουν τις ανοσιακές απαντήσεις και είναι υπεύθυνα για την ομοιόσταση του ανοσιακού συστήματος, ανευρίσκονται μειωμένα σε ασθενείς με ΙΑΘ. Τέλος, στα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα παρατηρείται αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με απόπτωση (perforin, Apo-1 Fas) και ανοσολογικό προφίλ Th1 ανοσολογικής απάντησης με αυξημένη INF- γ και IL-2 [26][27][28][29][30][31][32].

2. Η ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ

Η θρομβοποιητίνη (TPO) αποτελεί την κύρια κυτταροκίνη για την ανάπτυξη και ωρίμανση των μεγακαρυοκυτταρικών προβαθμίδων οδηγώντας στην παραγωγή ΑΜΠ. Σε καλλιέργειες *in vitro* επάγει της ενδομίτωση και την πολυπλοειδία των μεγακαρυοκυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητα των ΑΜΠ, αυξάνοντας την ικανότητας συσώρευσης και προσκόλλησης [33]. Η TPO παράγεται στο ήπαρ, ωστόσο έχουν περιγραφεί και άλλα σημεία

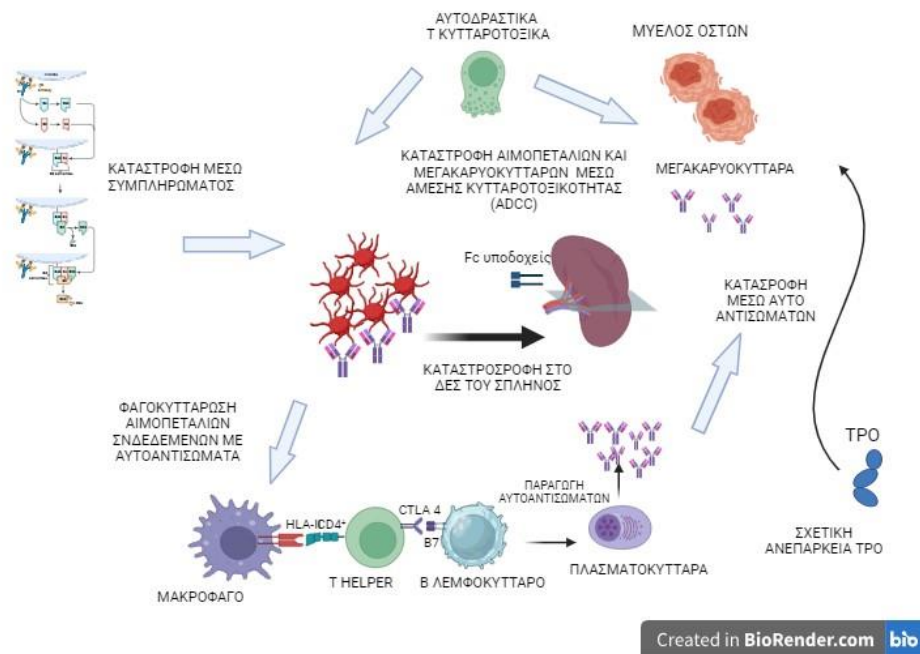
παραγωγής της όπως ο σπλήνας, οι νεφροί και τα στρωματικά κύτταρα του ΜΟ [34]. Η παραγωγή της ΤΡΟ ρυθμίζεται από το βαθμό κατανάλωσης-κάθαρσης του υποδοχέα της στα μεγακαρυοκύτταρα και στα ΑΜΠ. Έτσι, σε περιπτώσεις χαμηλού αριθμού αιμοπεταλίων, η θρομβοποιητίνη δεν καταναλώνεται σε μεγάλο βαθμό, ώστε ικανή ποσότητα να είναι διαθέσιμη για τη δράση της στο ΜΟ με τελικό σκοπό την παραγωγή αιμοπεταλίων. Ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα ΤΡΟ σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με θρομβοπενία λόγω μυελικής ανεπάρκειας όπως η απλαστική αναιμία [35][36]. Αντίθετα, μείωση των επιπέδων της θρομβοποιητίνης παρατηρείται σε καταστάσεις όπου μειώνεται η παραγωγή της όπως σε ηπατική ανεπάρκεια αλλά και σε περιπτώσεις όπου καταναλώνεται σε μεγάλο βαθμό. Τα επίπεδα της ΤΡΟ αυξάνονται σε ασθενείς με ΙΑΘ, αλλά η αύξηση αυτή δεν είναι ικανή να αντιρροπήσει τη θρομβοπενία. Σε ασθενείς με απλαστική αναιμία η ΤΡΟ αυξάνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με την ΙΑΘ [37]. Η συγκέντρωση της θρομβοποιητίνης δεν εξαρτάται από τον αριθμό των ΑΜΠ στις περισσότερες περιπτώσεις [38][39]. Η σχετική αυτή ανεπάρκεια της ΤΡΟ μπορεί να αποδοθεί σε αυξημένη απομάκρυνση της ΤΡΟ μαζί με τα αιμοπετάλια από το σύστημα των μακροφάγων. Τέλος, πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι ο ρυθμός παραγωγής (turnover) των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ΙΑΘ είναι «φυσιολογικός» ή ελαττωμένος και όχι αυξημένος ως αναμένεται με βάση τον μηχανισμό αυξημένης καταστροφής τους [40][41].

3. ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΠΟΙΗΣΗ

Μελέτες μορφολογίας περιέγραψαν ότι τα μεγακαρυοκύτταρα ασθενών με ΙΑΘ είναι αυξημένα σε αριθμό, με ελάττωση ή πλήρη εξάλειψη των κυτταροπλασματικών κοκκίων που τα καθιστούν μη αιμοπεταλιοπαραγωγά κύτταρα. Επίσης, μελέτες στο μικροσκόπιο έδειξαν εκφυλιστικές αλλοιώσεις στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των μεγακαρυοκυττάρων, καθώς και διάταξη μεμβρανών και εξοίδηση μιτοχονδρίων. Πιο πρόσφατες μελέτες σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έδειξαν συμπύκνωση χρωματίνης και κενотоπιώδες κυτταρόπλασμα στοιχεία συμβατά με παρα- απόπτωση [42][43].

Τα μεγακαρυοκύτταρα μοιράζονται ίδια αντιγόνα επιφανείας με τα αιμοπετάλια. Για το λόγο αυτό αποτελούν στόχο τόσο των αντι-αιμοπεταλιακών αντισωμάτων όσο και των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με ΙΑΘ έχουν αυξημένη παρουσία Τ-λεμφοκυττάρων στο ΜΟ. Τα λεμφοκύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από

αυξημένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης VLA-4 και CXCR1 που σχετίζονται με την επιλεκτική εγκατάσταση αυτών (τροπισμός) στον μυελό των οστών (homing-receptors) [44].



Εικόνα 1: Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί ΙΑΘ

Μελέτες σε ποντίκια απέδειξαν διαταραχή της μεγακαρυοποίησης μετά από επώαση με αντι-αιμοπεταλιακό ορό σε σχέση με μοντέλα ποντικίων που ανέπτυσαν θρομβοπενία με πολλαπλές αιμοπεταλιαφαιρέσεις [45]. Ακόμη, σε πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης, αντι-αιμοπεταλιακά αντισώματα έχουν ανευρεθεί προσδεμένα και στα μεγακαρυοκύτταρα [46][47][48][49].

1.1.4 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΚΗΣ ΠΟΡΦΥΡΑΣ

Η διάγνωση της ΙΑΘ αποτελεί μία διάγνωση εξ αποκλεισμού, καθώς δεν υπάρχουν ειδικές διαγνωστικές δοκιμασίες. Τα αντι-αιμοπεταλιακά αντισώματα είναι πολυκλωνικά IgG και δεν βοηθούν διαγνωστικά καθώς ανευρίσκονται σε χαμηλούς τίτλους στον ορό των πασχόντων, ενώ στο 50% των ασθενών είναι αρνητικά. Οι δοκιμασίες για την ανίχνευση τους έχουν χαμηλή ειδικότητα, δεν είναι εύκολα διαθέσιμες για αυτό και δεν χρησιμοποιούνται σαν δοκιμασίες ρουτίνας [50]. Η γρήγορη ανταπόκριση στη θεραπεία με γ-σφαιρίνη ενισχύει τη διάγνωση της νόσου.

Δεδομένου ότι σε ένα 20% των ασθενών η ΙΑΘ είναι δευτεροπαθής και ότι σε ένα 20% ασθενών με ιδιοπαθή ΙΑΘ συνυπάρχει και δεύτερο αυτοάνοσο νόσημα, κρίνεται αναγκαία η διερεύνηση ύπαρξης υποκείμενης νόσου ή άλλης νόσου αντίστοιχα. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται ο διαγνωστικός αλγόριθμος της διερεύνησης της ΙΑΘ. Όσον αφορά το ιστορικό του ασθενούς, τα αποτελέσματα μία μελέτης κοόρτης έδειξαν ότι το θετικό οικογενειακό ιστορικό για αυτοανοσία δεν σχετίζεται με την εμφάνιση της ΙΑΘ [51]. Στην εξέταση αίματος μπορεί να συνυπάρχει υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία σε περίπτωση εμμένουσας αιμορραγίας, ενώ η ανεπάρκεια της B12 και του φυλλικού μπορεί να προκαλέσει θρομβοπενία [52][53]. Με το επίχρισμα περιφερικού αίματος μπορεί να διαφοροδιαγνωσθεί η ΙΑΘ από ψευδο-θρομβοπενία (EDTA εξαρτώμενη) και άλλα νοσήματα όπως μικροαγγειοπαθητικές αιμολυτικές αναιμίες (παρουσία σχιστοκυττάρων) ή άλλα γενετικά σύνδρομα που συνδυάζονται με θρομβοπενία (π.χ. παρουσία μικρών αιμοπεταλίων) [54]. Η μελέτη του μυελού των οστών (ΜΟ) δεν πρέπει να αποτελεί εξέταση ρουτίνας αλλά να πραγματοποιείται σε ειδικές περιπτώσεις όπως πριν την σπληνεκτομή, πριν την έναρξη νέας θεραπείας, σε ασθενείς >60ετών προς αποκλεισμό άλλων αιματολογικών κακοήθων νοσημάτων [55][56].

ΑΠΟΔΕΛΕΙΓΜΕΝΟ ΟΦΕΛΟΣ	ΠΙΘΑΝΟ ΟΦΕΛΟΣ	ΜΗ ΑΠΟΔΕΛΕΙΓΜΕΝΟ ΟΦΕΛΟΣ
Ιστορικό ασθενούς	Ανίχνευση αντι-αιμοπεταλιακών αντισωμάτων	Μέτρηση ΤΡΟ
Οικογενειακό ιστορικό	Έλεγχος αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων	Έλεγχος πήξης
Κλινική εξέταση	Έλεγχος αντιθρεοειδικών αντισωμάτων	Μέτρηση συμπληρώματος
Γενική αίματος	Τεστ κύησης	
Επίχρισμα περιφερικού	Μέτρηση ANA	
Ποσοτική μέτρηση ανοσοσφαιρινών	PCR EBV.CMV, Parvo virus	
Ομάδα αίματος	Οστεομυελική βιοψία	
Έλεγχος HIV	Coombs	
Έλεγχος HBV	H. pylori	
Έλεγχος HCV		

Πίνακας 1: Συστάσεις για τη διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με υποψία ΙΑΘ

Επεξηγήσεις: : CMV: κυτταρομεγαλοϊός, EBV: Epstein Barr, PCR: αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης, ΤΡΟ: θρομβοποιητίνη, Η ποσοτική μέτρηση των ανοσοσφαιρινών συνιστάται σε παιδιά με ΙΑΘ, κυρίως σε εμμένουσα ή χρόνια μορφή για επανεκτίμηση της νόσου, από τη μελέτη των Provan D; Arnold DM; Bussel, βιβλ. 73

Ο προσδιορισμός της ομάδας Rhesus είναι αναγκαίος σε περίπτωση χρήσης anti-D σφαιρίνης ως θεραπεία [57]. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά είναι σημαντικός προς αποκλεισμό Κοινής Ποικίλης Ανοσοανεπάρκειας (level of evidence IV). Είναι γνωστό ότι ένα 20% ασθενών με CVID, εμφανίζουν ΙΑΘ και μάλιστα και πριν την εκδήλωση της νόσου. Μελέτες έδειξαν ότι ένα ποσοστό 25-30% ασθενών έχει θετικά αντιφωσφολιπιφικά αντισώματα χωρίς να επηρεάζει την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση της νόσου [58][59]. Από την άλλη πλευρά, 9% των παιδιών και έως και το 33% ενηλίκων με ΙΑΘ, έχουν θετικά ANA. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία των ANA μπορεί να αποτελεί δείκτη χρονιότητας της νόσου [60][61]. Γνωρίζοντας τη σχέση της εύρυθμης θυρεοειδικής λειτουργίας με την μεγακαρυοποίηση, καθώς ο υπερθυρεοειδισμός σχετίζεται με μείωση της διάρκειας επιβίωσης των ΑΜΠ και ο υποθυρεοειδισμός με μείωση της παραγωγής τους, ο έλεγχος της TSH, και των θυρεοειδικών αντισωμάτων είναι σημαντικός. Μελέτες έδειξαν ότι, η υποκλινική θυρεοειδοπάθεια μπορεί να αποτελεί αιτία μη ανταπόκρισης στη θεραπεία της θρομβοπενίας σε ασθενείς με ΙΑΘ [62][63].

1.1.5 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΚΗΣ ΠΟΡΦΥΡΑΣ

Με βάση τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της νόσου η θεραπεία της ΙΑΘ στοχεύει πρώτον στην ελάττωση της φαγοκυττάρωσης (κορτικοειδή, IVIG, anti-D σφαιρίνη, σπληνεκτομή), δεύτερον στην ελάττωση της παραγωγής αυτοαντισωμάτων από τα Β κύτταρα (ριτουξιμάμπη, ανοσοκατασταλτικά) και τρίτον στην αύξηση της παραγωγής αιμοπεταλίων (αγωνιστές ΤΡΟ). Τα κορτικοστεροειδή, η ενδοφλέβια γ-σφαιρίνη και η ενδοφλέβια anti-D σφαιρίνη παραμένουν οι θεραπευτικές επιλογές πρώτης γραμμής. Ωστόσο, μόνο 10-30% των ασθενών διατηρούν την ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία. Στην πλειονότητα των ασθενών απαιτείται θεραπεία δεύτερης γραμμής [64][65][66]. Η σπληνεκτομή αποβαίνει αποτελεσματική στα 2/3 των ασθενών, ωστόσο λόγω του κινδύνου των επιπλοκών δεν αποτελεί πρώτη επιλογή των κλινικών ιατρών [67]. Ανοσοκατασταλτικοί και κυτταροτοξικοί παράγοντες έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία σε ασθενείς με χρόνια και ανθεκτική ΙΑΘ. Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD20 και οι νέοι αγωνιστές του υποδοχέα θρομβοποιητίνης (romiplostim και το eltrombopag) είναι επίσημα διαθέσιμα φάρμακα σαν δεύτερης γραμμής θεραπεία [68].

Στόχος της θεραπευτικής προσέγγισης στην ΙΑΘ είναι η αύξηση αλλά και διατήρηση των επιπέδων των ΑΜΠ σε ασφαλή επίπεδα, μειώνοντας σημαντικά τον κίνδυνο αιμορραγικών

επιπλοκών, με τη λιγότερο τοξική θεραπεία. Η επιλογή της θεραπείας εξατομικεύεται σε κάθε ασθενή. Η ενεργός αιμορραγία, η τιμή των ΑΜΠ <20.000 μ L και η χρήση αντιπηκτικών φαρμάκων αποτελούν κάποιες ενδείξεις για έναρξης θεραπείας 1ης γραμμής. Σε περίπτωση μη ανταπόκρισης ή υποτροπής συστήνεται χορήγηση θεραπείας 2ης γραμμής. Στη θεραπεία 1ης γραμμής περιλαμβάνονται τα κορτικοστεροειδή, η ενδοφλέβια γ -σφαιρίνη και η ενδοφλέβια anti-D σφαιρίνη. Στη θεραπεία 2ης γραμμής περιλαμβάνονται οι 2ης γενιάς αγωνιστές του υποδοχέα της ΤΡΟ, το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD20, ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (αζαθειοπρίνη, κυκλοφωσφαμίδη) και η σπληνεκτομή [67]. Σε επείγουσα απειλητική για τη ζωή θρομβοπενία χρησιμοποιείται συνδυασμός θεραπευτικών επιλογών όπως χρήση IVIG και κορτικοστεροειδή, ενώ μπορεί να πραγματοποιηθεί και μετάγγιση αιμοπεταλίων καθώς να χορηγηθούν και αντι-ινοδωλυτικοί παράγοντες [68].

1.2 ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ

1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (AAA) αποτελεί ένα σύνολο διαταραχών που χαρακτηρίζονται από καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσω ανοσολογικού μηχανισμού. Συγκεκριμένα, παράγονται ειδικά αυτοαντισώματα έναντι αντιγόνων της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων που προκαλούν αιμόλυση και αναιμία [69]. Η νόσος διακρίνεται σε AAA θερμού και ψυχρού τύπου ανάλογα με τη θερμοκρασία στην οποία τα αυτοαντισώματα συνδέονται στη μεμβράνη των ερυθρών. Η ψυχρού τύπου AAA χωρίζεται περαιτέρω σε νόσο εκ ψυχρο-συγκολλητινών (CAD) και παροξυσμική ψυχρή αιμοσφαιρινουρία (ΠΝΗ). Η θερμού τύπου AAA είναι η πιο συχνή μορφή. Τα αυτοαντισώματα είναι IgG (Abs), στρέφονται κατά των αντιγόνων Rh και η καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων λαμβάνει χώρα στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Στη νόσο εκ ψυχρο-συγκολλητινών, τα αντισώματα είναι πενταμερή IgM (anti I/i) δρουν σε χαμηλές θερμοκρασίες, συνδέονται με τα ερυθρά και τα καταστρέφουν μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος (ενδαγγειακή αιμόλυση). Η νυκτερινή παροξυσμική αιμοσφαιρινουρία, ο σπανιότερος από όλους τους τύπους AAA, είναι μία αυτοπεριοριζόμενη νόσος, συνήθως μεταλοιμώδης και εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά μετά από ιογενή συνδρομή. Κύριος μηχανισμός καταστροφής των

ερυθρών είναι τα IgG Abs που δρουν σε χαμηλές θερμοκρασίες και μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος καταστρέφουν τα ερυθρά (ενδαγγειακά). Η ενδαγγειακή αιμόλυση είναι 10 φορές ισχυρότερη από την εξωαγγειακή. Η βάση για την απορρύθμιση του ανοσοποιητικού που οδηγεί στην παραγωγή αντισωμάτων κατά των ερυθροκυττάρων είναι ακόμη σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Πρόσφατες μελέτες έχουν ανακαλύψει αρκετούς μηχανισμούς απορρύθμισης των T-κυττάρων όπως μείωση των T-ρυθμιστικών κυττάρων και αύξηση των φλεγμονωδών κυττάρων Th17. Η αντισταθμιστική ερυθροβλαστική ικανότητα του ΜΟ είναι αυτή που θα καθορίσει τη βαρύτητα της αναιμίας και την κλινική ετερογένεια της νόσου. Η πρόοδος στην κατανόηση της παθογένειας της AAA μπορεί να οδηγήσει τελικά στην ανάπτυξη στοχευμένης θεραπείας [70].

1.2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΙΜΙΑΣ

Η AAA θερμού τύπου αποτελεί το 70% των περιπτώσεων AAA. Η ετήσια επίπτωση είναι 1 ανά 75.000-80.000 άτομα. Η νόσος εμφανίζεται τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες. Η πρωτοπαθής θερμού τύπου AAA αντιπροσωπεύει περίπου το 50-60% των αναφερόμενων περιπτώσεων, ενώ οι δευτεροπαθείς περιπτώσεις συνδέονται με λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές, λοιμώξεις, ανοσοανεπάρκεια και κακοήθειες. Η νόσος εκ ψυχροσυγκολλητινών (CAD) αποτελεί το 15% της AAA. Στην πλειονότητα των ασθενών εκτός από την αιμόλυση, οι κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν συμπτώματα ως απότοκο της έκθεσης σε ψύχος, όπως τη νόσο Raynaud και την ακροκυάνωση [71][72]. Η παροξυσμική ψυχρή αιμοσφαιρινουρία (PCH) ευθύνεται για το 2-5% όλων των περιπτώσεων AAA, με υψηλότερη συχνότητα μεταξύ των παιδιών. Σε μία μελέτη που συμμετείχαν 68 παιδιά με AAA σε ένα διάστημα 4 ετών, το 32,4% αυτών είχε PCH. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα επεισόδια μαζικής αιμόλυσης μετά από έκθεση στο κρύο. Η νόσος έχει συνδεθεί με συγγενή ή τριτογενή σύφιλη, ενώ πιο συχνά εμφανίζεται σε παιδιά μετά από ιογενή λοίμωξη.

1.2.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΙΜΙΑΣ

Τα πιο συχνά αυτοαντισώματα έναντι των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι τα IgG, τα οποία προκαλούν κυρίως εξωαγγειακή αιμόλυση μέσω κυτταροτοξικότητας εξαρτώμενης από αντίσωμα (ADCC) στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (σπλήνα και σε μικρότερο βαθμό ήπαρ). Τα IgG1 μαζί με τα IgG3 είναι ικανά να ενεργοποιήσουν το συμπλήρωμα. Τα αυτοαντισώματα αυτής της κατηγορίας στρέφονται κατά των επιτόπων του συστήματος Rh. Δρουν στους 37°C και ως εκ τούτου ευθύνονται για AAA θερμού τύπου. Τα IgM είναι πενταμερή αυτοαντισώματα ικανά να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα προκαλώντας κατά κύριο λόγο ενδαγγειακή αιμόλυση και σε μικρότερο βαθμό με τη μεσολάβηση του C3d, εξωαγγειακή λύση (κυρίως στο ήπαρ). Αυτοαντισώματα αυτής της κατηγορίας στρέφονται ενάντια στο ερυθροκυτταρικό σύστημα I/i. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους είναι οι 4°C και ευθύνονται για την AAA ψυχρού τύπου [73][74].

Η διαμεσολαβούμενη από T-κύτταρα καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεια της AAA. Η απώλεια τόσο της κεντρικής όσο και της περιφερικής ανοσοανοχής και οι μηχανισμοί όπως η μοριακή μίμηση αποτελούν παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της νόσου. Η αυξημένη κυτταροτοξικότητα των NK φυσικών φονικών κυττάρων έναντι των αυτόλογων ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς και η αυξημένη δραστηριότητα των T αυτοδραστικών κυττάρων έχουν περιγραφεί στην παθογένεια της AAA. Αυξημένα επίπεδα των Th17 κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται στενά με την ενεργότητα της νόσου. Ακόμη σε ασθενείς με AAA έχουν βρεθεί μειωμένα επίπεδα T ρυθμιστικών κυττάρων και αυξημένα επίπεδα IL-12. Είναι γνωστό ότι τα ρυθμιστικά T κύτταρα εκκρίνουν IL-10 και TGF-β και η διαταραχή της ισορροπίας IL-10/ IL-12 παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου και στη χρονιότητα. Όλες οι ανοσολογικές διαταραχές δείχνουν μία υπέρμετρη Th2 ανοσολογική απόκριση [75][76].

1.3 ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ

Η αυτοάνοση ουδετεροπενία χαρακτηρίζεται από παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι των ουδετεροφίλων. Αυτός ο τύπος της ουδετεροπενίας αποτελεί την πιο συχνή αιτία

ουδετεροπενίας σε παιδιά 6 μηνών έως 4 ετών. Οι ασθενείς σπάνια εμφανίζουν σοβαρές βακτηριακές λοιμώξεις. Η ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων δεν αποτελεί εξέταση ρουτίνας, καθώς πραγματοποιείται σε εξειδικευμένα εργαστήρια. Η πρόγνωση είναι εξαιρετική καθώς στο μεγαλύτερο ποσοστό των παιδιών τα ουδετερόφιλα αποκαθίστανται σε φυσιολογικά επίπεδα σε ηλικία 3 ετών. Δεν υπάρχει στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση, η χορήγηση αντιβιοτικών καθώς και G-CSF αποτελούν πρόσκαιρη και συμπτωματική θεραπεία. Η νόσος εμφανίζεται συχνά και σε νέα άτομα (ηλικίας 20-40 ετών), κυρίως γυναίκες και συχνά συνδυάζεται με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα.

1.4 ΣΥΝΔΡΟΜΟ EVANS

Το σύνδρομο Evans αποτελεί μια αυτοάνοση διαταραχή που εμφανίζεται με 2 ή και περισσότερες κυτταροπενίες, συμπεριλαμβάνοντας πιο συχνά την αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (AAA) και την αυτοάνοση θρομβοπενία (ΙΑΘ) και πιο σπάνια την αυτοάνοση ουδετεροπενία. Η AAA που εμφανίζεται στο σύνδρομο Evans είναι θερμού τύπου, όπου αυτοαντισώματα IgG συνδέονται με αντιγόνα στην μεμβράνη των ερυθρών σε θερμοκρασία του σώματος. Όσον αφορά την ΙΑΘ, αυτοαντισώματα στρέφονται ενάντια επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών GPIIb/IIIa των αιμοπεταλίων. Η αιτιοπαθογένεια της όσου δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Αυτοδραστικά Β κύτταρα παράγουν αντισώματα έναντι ιδίων αντιγόνων επιφανείας των κυττάρων του αίματος και προκαλούν αντίστοιχες κυτταροπενίες. Μπορεί να είναι πρωτοπαθές (ιδιοπαθές) ή δευτεροπαθές και να συνυπάρχει με ρευματικά νοσήματα, ΚΠΑ και λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Το σύνδρομο Evans αποτελεί μία σπάνια νόσο και εμφανίζεται σε λιγότερο από το 5% των ασθενών με ΙΑΘ ή AAA κατά την έναρξη της νόσου. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 52 έτη και εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες (Γ/Α = 3/2). Τα κορτικοειδή και η IVIG αποτελούν πρώτης γραμμής θεραπεία. Η ριτουξιμάμπη αποτελεί δεύτερης γραμμής θεραπεία, ενώ η σπληνεκτομή, τα ανοσοσκατασταλτικά και η δαναζόλη αποτελούν θεραπευτικές επιλογές δεύτερης γραμμής [77].

2. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

Οι πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες αποτελούν ένα ετερογενές σύνολο νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από διαφορετικού βαθμού διαταραχή του ανοσιακού συστήματος. Μπορεί να αφορούν είτε τη χυμική είτε την κυτταρική ανοσία και το ανοσολογικό έλλειμα να εντοπίζεται στο στάδιο της ωρίμανσης, του πολλαπλασιασμού, της σηματοδότησης, της επικοινωνίας και του αριθμού των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι αντισωματικές ανεπάρκειες αποτελούν την πιο συχνή μορφή ΠΑΑ και αντιπροσωπεύουν τα 2/3 των περιπτώσεων. Πρόκειται σχεδόν αποκλειστικά για Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες (ΠΑΑ), όπως η Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (ΚΠΑ), η Εκλεκτική Ανεπάρκεια της IgA, η Εκλεκτική Ανεπάρκεια Υποτάξεων της IgG και η Ανεπάρκεια Αντισωματικών Απαντήσεων Η Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (ΚΠΑ) αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αντισωματική ανεπάρκεια μετά από την εκλεκτική ανεπάρκεια της IgA, με επιπολασμό 1/25000-1/50000 περίπου. Τα επιδημιολογικά δεδομένα τόσο για την ΚΠΑ όσο και για τις υπόλοιπες ΠΑΑ θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν με επιφύλαξη λόγω του αυξημένου ποσοστού υποδιάγνωσης της νόσου. Η νόσος εμφανίζεται τόσο πρώιμα κατά την παιδική ηλικία, όσο και όψιμα κατά την ενήλικη ζωή (3η – 4η δεκαετία ζωής). Χαρακτηρίζεται από υπογαμμασφαιριναιμία που συνδυάζεται με μειωμένα επίπεδα της IgA και μειωμένα επίπεδα της IgM στο 70-80% και στο 50% των περιπτώσεων αντίστοιχα [78][79]. Εκτός της υπογαμμασφαιριναιμίας η ΚΠΑ χαρακτηρίζεται από μειωμένες αντισωματικές απαντήσεις έναντι πολυσακχαριτιδικών αντιγόνων (κυρίως) και αυξημένο κίνδυνο υποτροπιάζουσων λοιμώξεων, αυτοάνοσων νοσημάτων, λεμφουπερπλασίας και κακοηθειών. Οι λοιμώξεις αφορούν κυρίως το ανώτερο και το κατώτερο αναπνευστικό αλλά και το γαστρεντερικό σύστημα (χρόνιο διαρροϊκό σύνδρομο και λοιμώξεις από *Gardia Lamblia*). Έχουν αναφερθεί νεοπλάσματα του γαστρεντερικού όσο και λεμφώματα με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με ΚΠΑ από ότι στο γενικό πληθυσμό [80][81].

Η αιτιοπαθογένεια της νόσου είναι αδιευκρινίστη. Αναφέρεται σε ένα 20% των ασθενών οικογενειακή κατανομή, ωστόσο στις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν έχει ανευρεθεί κάποια αιτιοπαθογενετική σχέση. Στο 1/5 των περιπτώσεων ανιχνεύονται μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση του Β κυττάρου. Εώς σήμερα έχουν ανευρεθεί μεταλλάξεις σε πάνω από 30 γονίδια που να σχετίζονται με τη νόσο. Βιβλιογραφικές

αναφορές για μεταλλάξεις γονιδίων αιτιοπαθογενετικά σχετιζόμενες με την ΚΠΑ (ICOS, TACI), εμφανίστηκαν για πρώτη φορά το 2003. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* αποτελούν τις πιο συχνές γενετικές βλάβες και εμφανίζονται σε ένα 10-15% των ασθενών με ΚΠΑ [82][83].

2.1 ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΟΙΝΗΣ ΠΟΙΚΙΛΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω οι ασθενείς με ΚΠΑ εμφανίζουν πιο συχνά αυτοάνοσα νοσήματα σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα, αυτοάνοσες διαταραχές εμφανίζονται στο 1/3 των ασθενών με ΚΠΑ με πιο συχνές τις αυτοάνοσες κυτταροπενίες. Η ΙΑΘ είναι η συχνότερη αυτοάνοση αιματολογική διαταραχή ακολουθούμενη από την ΑΑΑ. Το χαρακτηριστικό των αυτοάνοσων κυτταροπενιών είναι ότι μπορεί να εμφανιστούν ακόμη και έτη πριν την πλήρη εκδήλωση του κλινικού φαινοτύπου της ΚΠΑ. Για το λόγο αυτό σε ασθενείς με πρωτοδιάγνωση αυτοάνοσης κυτταροπενίας και ειδικά ΙΑΘ, πραγματοποιείται ποσοτική μέτρηση των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM προς αποκλεισμό αντισωματικής ανεπάρκειας [84][85].

2.2 ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΤΩΝ ΥΠΟΤΑΞΕΩΝ ΤΗΣ IgG ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η μέτρηση των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων αποτελεί βασική εξέταση για την εκτίμηση του ανοσιακού συστήματος, ιδιαίτερα σε άτομα με ιστορικό υποτροπιάζουσων λοιμώξεων. Η ποσοτική μέτρηση των υποτάξεων πραγματοποιείται με κλασσικές εργαστηριακές μεθόδους όπως Elisa και νεφελομετρία. Οι τιμές και τα φυσιολογικά όρια καθορίζονται ανάλογα το φύλο και την ηλικία του ασθενούς [86].

Η εκλεκτική ανεπάρκεια των υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών ανήκει στην οικογένεια των πρωτοπαθών αντισωματικών ανεπαρκειών (Primary Antibody Deficiency-PAD). Χαρακτηρίζεται από φυσιολογικές τιμές των τάξεων των ανοσοσφαιρινών IgG, IgM, IgA αλλά από μείωση των τιμών μίας ή και περισσότερων υποτάξεων πάνω από 2SD από τις φυσιολογικές

για την ηλικία τιμές, που δεν οφείλονται σε άλλα δευτεροπαθή αίτια. Για την επιβεβαίωση της ανεπάρκειας χρειάζεται επαναληπτική μέτρηση μετά από ένα μήνα [87][88][89]. Οι ασθενείς με επιλεκτική ανεπάρκεια των υποτάξεων της IgG μπορεί να πάσχουν από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις ιδίως του ανωτέρου αναπνευστικού είτε μπορεί να είναι τελείως ασυμπτωματικοί. Ωστόσο, ανεπάρκεια υποτάξεων μπορεί να υπάρχει σε κλινικά υγιή άτομα και να μην αξιολογείται, χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μεμονωμένη ανεπάρκεια της IgG4. Οι τιμές των υποτάξεων δεν συνδέονται ανάλογα με την επίπτωση λοιμώξεων, καθώς ασθενείς με πολύ χαμηλά επίπεδα μπορεί να είναι και ασυμπτωματικοί. Η κλινική σημασία της νόσου είναι ασαφής [90][91]. Εμφανίζεται στο 2,5% του πληθυσμού. Οι ασθενείς με εκλεκτική ανεπάρκεια υποτάξεων πάσχουν εκτός των υποτροπιάζουσων λοιμώξεων από αλλεργικά και αυτοάνοσα νοσήματα πιο συχνά από ότι ο γενικός πληθυσμός [92][93]. Καθώς η IgG1 αποτελεί το 60% της συνολικής IgG, ανεπάρκεια της IgG1 θα οδηγήσει σε υπογαμμασφαιριναιμία. Για αυτό οι πιο συχνές μεμονωμένες ανεπάρκειες των υποτάξεων της IgG είναι οι IgG3 και IgG2. Η ανεπάρκεια της IgG3 είναι πιο συχνή στους ενήλικες, ενώ η ανεπάρκεια της IgG2 είναι πιο συχνή στα παιδιά, με επίπτωση 1 στα 10.000 άτομα. Πολλές φορές η IgG2 ανεπάρκεια συνυάζεται με IgA ανεπάρκεια. Αξίζει να επισημάνουμε ότι οι εκλεκτικές ανεπάρκειες των υποτάξεων στα παιδιά συχνά εξαφανίζονται στην ενηλικίωση τους. Ωστόσο, κάποιες περιπτώσεις μπορεί να εξελιχθούν σε κοινή ποικίλη ανσοανεπάρκεια CVID, ιδίως σε ασθενείς με ανεπάρκεια IgA και IgG2 και με μειωμένες αντισωματικές απαντήσεις. Δεν υπάρχουν προγνωστικοί παράγοντες εξέλιξης της νόσου, για αυτό μετά τη διάγνωση χρειάζεται τακτική ποσοτική μέτρηση και εκτίμηση του ασθενούς [94][95].

Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν διαπιστώνεται κληρονομική μεταβίβαση. Η σταθερή περιοχή βαριάς αλυσίδας ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης (IGHC) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 και περιέχει 9 λειτουργικά γονίδια (μ-δ-γ3-γ1-Ψε-α1-Ψγ-γ2-γ4-ε-α2). Σε μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 11.000 υγιή άτομα, το 1-3% βρέθηκαν ετεροζυγώτες ως προς διαφορετικές ελλείψεις του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας. Η συχνότητα ελλείψεων γονιδίων IGHG στον Καυκάσιο πληθυσμός είναι περίπου 1,5%. Η ομοζυγωτία οδηγεί σε πλήρη ανεπάρκεια της αντίστοιχης υποτάξης και είναι αρκετά σπάνια (1 σε 5.000-10.000 υγιή πληθυσμό). Η συχνότητα των γονδιακών ελλείψεων στον πληθυσμό της Γκάμπιας (Νεγροειδής) είναι 4% αλλά μόνο μία μορφή διαγραφής το C4 έχει βρεθεί μέχρι σήμερα [96]. Μία μελέτη περιέγραψε μία ομόζυγη προσθήκη βάσης (1793insG) στο εξόνιο 4 της γ2 γονιδιακής αλυσίδας η οποία

ανευρέθηκε σε έναν Ιάπωνα ασθενή με εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG2 [97]. Σε μία άλλη μελέτη περιγράφηκαν δύο αδέρφια με ομόζυγη διαγραφή γονιδίων στη περιοχή της βαριάς αλυσίδας που είχαν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα IgA1, IgG2, IgG4 και IgE [98]. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί και διπλασιασμοί των ανοσογονιδίων της βαριάς αλυσίδας. Η συχνότητα ετερόζυγων διπλασιασμών είναι πιο συχνή από τις ελλείψεις γονιδίων. Πάνω από το 20% των Καυκάσιων είναι ετερόζυγοι ως προς διπλασιασμούς ανοσογονιδίων ειδικά της γ2 και γ4 βαριάς αλυσίδας [99][100]. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις οι εκλεκτικές ανεπάρκειες υποτάξεων της ανοσοσφαιρίνης προκαλούνται κυρίως από διαταραχές της έκφρασης των ανοσογονιδίων. Παρατηρούνται διαταραχές σε επίπεδο πριν και μετά την ισοτυπική μεταστροφή των υποτάξεων, όπως εκτροπές σε ρυθμιστικές ακολουθίες 5' ρυθμιστικές ακολουθίες 3' ή παραγωγή ή απόκριση σε επιλεγμένες κυτοκίνες [101]. Στους περισσότερους ασθενείς με IgG3 ανεπάρκεια τα μειωμένα επίπεδα της IgG3 οφείλονται σε μειωμένη ισοτυπική μεταστροφή ως προς τη συγκεκριμένη υποτάξη [102].

Αντίστοιχες αναφορές μεταξύ της συσχέτισης των μειωμένων επιπέδων ανοσοσφαιρινών με τη διαταραχή της ισοτυπικής μεταστροφής περιγράφονται σε IgA ανεπάρκεια και σε αταξία-τηλεαγγειεκτασία [103][104]. Ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις η ισοτυπική μεταστροφή πραγματοποιείται κανονικά. Σε σπάνιες περιπτώσεις, τα μειωμένα επίπεδα των υποτάξεων μπορεί να οφείλονται σε αυξημένο καταβολισμό της IgG [105][106]. Μπορεί να υπάρχει προγνωστική σημασία στη διάκριση μεταξύ της εκλεκτικής ανεπάρκειας υποτάξεων που προκαλείται από διαγραφή γονιδίου και από αυτή που οφείλεται σε ανοσορρυθμιστική δυσλειτουργία. Περισσότερες μελέτες χρειάζονται για την ακριβή αιτιοπαθογενετική σχέση μεταξύ των διαταραχών αυτών και του κλινικού φαινοτύπου της νόσου.

Ο αλλότυπος κάθε ατόμου μπορεί να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών, ιδίως της IgG3 και IgG2 [107][108][109]. Για παράδειγμα, έχει περιγραφεί εκλεκτική ανεπάρκεια IgG3 σε ασυμπτωματικό ασθενή που είναι ομόζυγος ως προς τον αλλότυπο G3m (g) ή G3m(b). Από την άλλη πλευρά, άτομα ομόζυγα ως προς τον G3m(b) αλλότυπο έχουν υψηλότερες τιμές IgG3 στον ορό από ότι άτομα ομόζυγα για τον G3m(g) αλλότυπο. Επιπλέον, το 60-70% των ατόμων που είναι ομόζυγα για τον Gm2(n) αλλότυπο έχουν υψηλότερα επίπεδα IgG2 στον ορό και καλύτερες αντισωματικές απαντήσεις τόσο σε πρωτεϊνικά όσο και σε πολυσακχαριτιδικά αντιγόνα. Άτομα που δεν φέρουν τον αντίστοιχο

αλλότυπο έχουν 7 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν μειωμένες αντισωματικές απαντήσεις. Όπως καταλαβαίνουμε η επιβεβαίωση και η κλινική σημασία της εκλεκτικής ανεπάρκειας των υποτάξεων είναι μία σύνθετη οντότητα με δυσκολίες τόσο στην κατανόηση της παθογένειας όσο και στη διαχείριση των ασθενών. Ένα 15% υγιών παιδιών και ένα 10% ενηλίκων έχουν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα IgG4 ανοσοσφαιρίνης [110]. Επίσης, μελέτες αναφέρουν ότι η εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG3 μπορεί να οφείλεται σε αυξημένο καταβολισμό της λόγω υποτροπιάζουσων λοιμώξεων, λαμβάνοντας υπόψιν και τον μικρό χρόνο ημίσειας ζωής της. Αυτές οι παρατηρήσεις έχουν οδηγήσει πολλούς κλινικούς να αμφισβητούν την πραγματική κλινική σημασία της εκλεκτικής ανεπάρκειας των υποτάξεων.

Κατά την εκτίμηση του ασθενούς με υποψία αντισωματικής ανεπάρκειας, η αξιολόγηση των αντισωματικών απαντήσεων σε πρωτεϊνικά και πολυσακχαριτιδικά αντιγόνα μας δίνει σημαντικές πληροφορίες. Σε ασθενείς με επιλεκτική ανεπάρκεια υποτάξεων της IgG, οι απαντήσεις σε πρωτεϊνικά εμβόλια είναι συνήθως φυσιολογικές, ενώ οι απαντήσεις σε πολυσακχαριτιδικά μπορεί να είναι είτε φυσιολογικές είτε μειωμένες, ιδίως σε ασθενείς με IgG2 ανεπάρκεια. Συνήθως οι ασθενείς δεν χρήζουν θεραπεία. Ωστόσο, σε εμμένουσες και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις μπορεί να χορηγηθούν αντιβιοτικά, ενώ σε πιο σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να χορηγηθεί ακόμη και θεραπεία υποκατάστασης με γ-σφαιρίνη. Η θεραπεία με γ-σφαιρίνη έχει αποδειχθεί ότι χρησιμεύει ως μέσο πρόληψης για την μείωση της επίπτωσης βρογχεκτασιών, απώλειας ακοής και μη αναστρέψιμων διαταραχών οργάνων, ως αποτέλεσμα χρόνιων λοιμώξεων [111][112].

2.3 Η ΣΧΕΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΤΑΞΕΩΝ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΠΕΝΙΕΣ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Οι ποσοτικές διαταραχές των υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών του ορού έχουν συσχετιστεί με νοσήματα αυτοάνοσα και μη. Στον πίνακα 2 αναφέρονται μελέτες που έχουν περιγράψει διαταραχές των υποτάξεων ορού σε ασθενείς που πάσχουν από διάφορα νοσήματα. Για παράδειγμα, ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα έχουν αυξημένα επίπεδα IgG1 στον ορό και ασθενείς με σ. Sjogren έχουν αυξημένα IgG1 και μειωμένα επίπεδα IgG2. Από την άλλη,

ασθενείς με πρωτοπαθή χολική κίρρωση έχουν αυξημένη τη IgG3. Τα αυξημένα επίπεδα μίας συγκεκριμένης υποτάξης μπορεί να οφείλονται σε επιλεκτική παραγωγή της, μετά την απελευθέρωση συγκεκριμένων κυτταροκινών. Καθώς η IgG1 αντικατοπτρίζει την συνολική IgG του ορού, πολλά αυτοάνοσα νοσήματα συνοδεύονται από υπεργαμμοσφαιριναιμία. Ωστόσο η αύξηση αυτή δεν πρέπει πάντα να αποδίδεται σε κλωνική επέκταση των Β κυττάρων που οδηγεί σε υπέρμετρη παραγωγή αντισωμάτων καθώς ταυτόχρονα μπορεί να συνυπάρχει ανεπάρκεια κάποιων υποτάξεων. Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι ο μηχανισμός είναι πιο περίπλοκος. Όσον αφορά τις αυτοάνοσες κυτταροπενίες, έχουν γίνει μελέτες ποσοτικού προσδιορισμού των ανοσοσφαιρινών με ποικίλα αποτελέσματα και αρκετές ερμηνείες. Η συσχέτιση των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών με την ΙΑΘ διαφέρει στη νόσο των ενηλίκων και των παιδιών. Τα αποτελέσματα των μελετών θα αναλυθούν διεξοδικά στο κομμάτι της συζήτησης.

Λοιμώξεις	Διαταραχές υποτάξεων	Βιβλιογραφική αναφορά
Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις από βακτήρια με κάψα	Μειωμένη IgG2/IgG4	<i>Oxelius (1984)</i> <i>Hammarston and Smith</i>
Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις ανωτέρου αναπνευστικού	Μειωμένη IgG2/IgG3/IgG4	<i>Bjorkander et al (1985)</i> , <i>Umetsu. Ambrosino and Geha (1985)</i>
Βρογχεκτασίες	Μειωμένη IgG2/IgG3/IgG4	
Μέση πυώδης ωτίτιδα σε παιδιά	Μειωμένη IgG2 αντισώματα πνευμονικόκκου	<i>Freijd et al (1984)</i> <i>Goldblatt et al (1989)</i>
Κυστική ίνωση με χρόνια λοίμωξη από <i>P. Aeruginosa</i>	Αυξημένη IgG2	<i>Fick et al (1986)</i>
Μητέρες παιδιών με σήψη από στρεπτόκοκκο ομάδας B AIDS	Μειωμένη IgG2/IgG2/IgG3 Ποικίλες διαταραχές	<i>Oxelius et al (1983)</i> <i>Auscoutusier et al (1986)</i> <i>Parkin (1988)</i>
Γαστρεντερικές διαταραχές		
Διάρροια, αλλεργία στη πρωτεΐνη του μητρικού γάλατος, τροφική αλλεργία	Ποικίλες διαταραχές	<i>Bremard-Oury et al (1986)</i>
Αλλεργικά νοσήματα		
Άσθμα	Μειωμένη IgG2/IgG3/IgG4	<i>Oxelius (1984)</i> <i>Page et al (1988)</i>
Ατοπική δερματίτιδα	Αυξημένη IgG4	<i>Merret et al (1984)</i>
Αγγειίτιδα Henoch-schonlein	Ποικίλες διαταραχές	<i>Bremaar-Ouy et al (1986)</i>
Αυτοάνοσα νοσήματα (ΣΔ1)	Μειωμένη IgG3	<i>Oxelius (1986)</i>
Νευρολογικές διαταραχές		
Θεραπεία ανθεκτικής επιληψίας	Μειωμένη IgG2	<i>Arizumi Shiihara and Hibio (1983)</i>
Αταξία Friedrich	Μειωμένη IgG3	<i>Oxelius (1986)</i>
Αταξία τηλεαγγειεκτασία	Μειωμένη IgG2/IgG4	<i>Revat-Peran Buriot and Salier (1981)</i>
Ανοσοανεπάρκειες		
Ανεπάρκεια συστατικών του συμπληρώματος	Μειωμένη IgG4	<i>Bird and Lachmann (1987)</i>
C3 ανεπάρκεια	Μειωμένη IgG2	<i>Bird and Lachmann (1987)</i>
IgA ανεπάρκεια	Μειωμένη IgG2/IgG3/IgG4	<i>Oxelius (1981)</i>
Μετά από MMO	Ποικίλες διαταραχές	<i>Preud'homme et al (1988)</i>
AID ανεπάρκεια	Μειωμένη IgG2	<i>Levy et al (1988)</i>

Πίνακας 2: Επίπεδα ανοσοσφαιρινών και υποτάξεων σε αυτοάνοσα και μη νοσήματα.

3. Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ TACI

3.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ TACI

Ο υποδοχέας TACI (Transmembrane Activator και CAML Interactor, *TNFRSF13B*, CD267) ανήκει στην υπεροικογένεια των TNF υποδοχέων και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων. Είναι μια διαμεμβρανική τύπου ΙΙΙ πρωτεΐνη που αποτελείται από 293 αμινοξέα και κωδικοποιείται από γονίδιο *TNFRSF13B*, το οποίο εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (17p11.2), περιοχή που αποτελεί συχνά στόχο για μεταλλάξεις και ανασυνδυασμούς [113][114]. Το γονίδιο αποτελείται από 5 εξόνια τα οποία κωδικοποιούν τον πρωτεϊνικό υποδοχέα ως εξής εξόνιο 1: αμινοξέα 1-20, εξόνιο 2: αμινοξέα 21-66, εξόνιο 3: αμινοξέα 67-148, εξόνιο 4: αμινοξέα 149-210 και εξόνιο 5: αμινοξέα 211-293. Υπάρχουν δύο τμήματα πλούσια σε κυστείνες CRD-1 και CRD-2 τα οποία είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του κυτταρικού υποδοχέα και τη σύνδεση των συνδετών του, των μορίων BAFF/APRIL, αντίστοιχα. Το CRD-1 τμήμα εκτείνεται από το 32 αα έως το 67 αα, που λείπει από μια ισομορφή του *TNFRSF13B* και το CRD-2 από το 68 αα έως το 106 αα [115]. Το διαλυτό μόριο του υποδοχέα TACI δημιουργείται μετά από εναλλακτικό μάτισμα και προκύπτει η short TACI πρωτεΐνη, που αποτελείται από ένα τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνη CRD-1 και συμμετέχει στην ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου μονοπατιού NF-Κβ. Οι περιοχές επαναλήψεων κυστεΐνης που είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση των συνδετών του υποδοχέα αποτελούν μοναδικό χαρακτηριστικό και διακρίνουν τον υποδοχέα TACI από τα άλλα μέλη των TNF υποδοχέων [115][116].

Η πρωτεΐνη TACI πλην του μονοπατιού NF-κβ, ενεργοποιεί και τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 αλλά και την αμινοτελική κινάση c-Jun. Το ενδοκυττάριο τμήμα αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες TRAFs, αλλά μόνο η TACI αλληλεπιδρά με την CAML. Τα μόρια B-Cell Activating Factor (BAFF, *TNFSF13C*, CD257) και A-Proliferation Inducing Ligand (APRIL, *TNFRSF13A*, CD256) είναι οι κύριοι συνδέτες του υποδοχέα TACI, εμφανίζοντας παρόμοια συγγένεια και ειδικότητα. Ο BAFF (γνωστός και ως BLyS, THANK, TALL-1 και zTNF4) ενισχύει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των Β-κυττάρων, ενώ αυξημένες συγκεντρώσεις του έχουν βρεθεί σε διάφορα νοσήματα, τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα [117][118]. Ο APRIL (γνωστός ως *TNFRSF13A*, Tall- 2, και TRDL-1), επάγει

την ισοτυπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συγγένεια σύνδεσης των BAFF και APRIL στον υποδοχέα TACI είναι παρόμοια, ενώ επιπρόσθετα, ετεροτριμερή των BAFF και APRIL μπορούν να ενεργοποιήσουν τον σηματοδοτικό καταρράκτη του υποδοχέα. Τα BAFF/APRIL ετεροτριμερή μπορούν να προσδένονται στον TACI, αλλά όχι στους άλλους δύο TNFR υποδοχείς BCMA (B Cell Maturation Antigen) ή BAFFR, στους οποίους οι συνδέτες APRIL και BAFF μπορούν να συνδεθούν αντίστοιχα [119][120][121]. Τέλος, η πρωτεογλυκάνη (heparan sulphate proteoglycans, HSPGs) syndecan-2 μπορεί επίσης να δρα ως συνδέτης του TACI, βασιζόμενη αποκλειστικά στις πλευρικές αλυσίδες της. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο TACI υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιείται και από άλλες HSPG in vivo (π.χ. syndecan-4). Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι ο συνδέτης APRIL μπορεί να συνδέεται ανεξάρτητα σε πρωτεογλυκάνες όπως η syndecan-1 (CD138), δημιουργώντας ένα βιολογικά ενεργό σύμπλοκο, στην επιφάνεια των πλασματοκυττάρων. Αν και δεν είναι πλήρως γνωστή η χρησιμότητα της σύνδεσης αυτής, πιστεύεται όμως ότι είναι πολύ σημαντική για τον πολυμερισμό του APRIL κατά την σύνδεσή του στον TACI υποδοχέα και ίσως εξηγεί τα εναλλακτικά αποτελέσματα κατά την σηματοδότηση του στα B-κύτταρα [122][123].

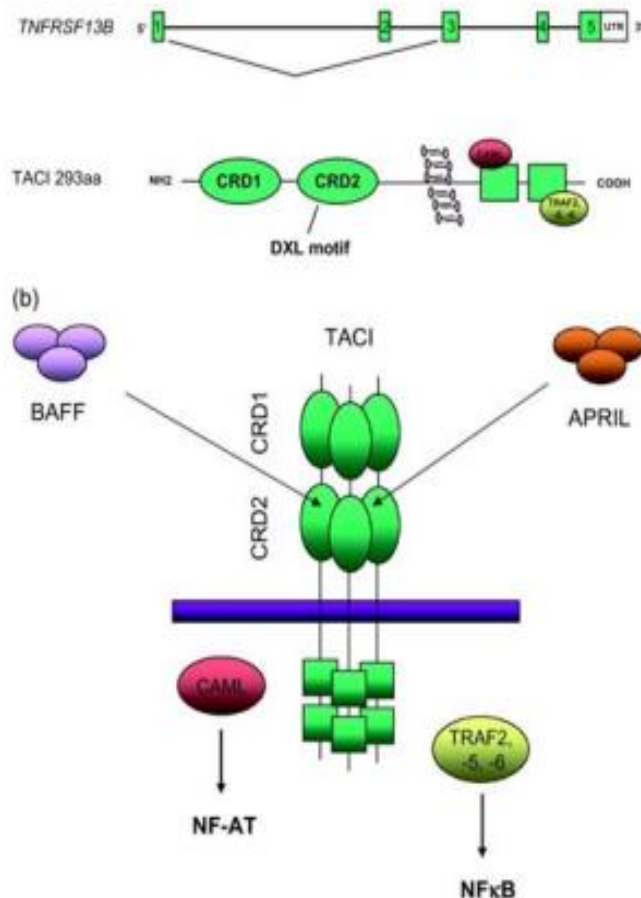
Αρχικά κατά την ενεργοποίηση του παρθένου B κυττάρου ο υποδοχέας BAFF εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό, ενώ ο TACI είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμος. Ωστόσο η έκφραση του αρχίζει να αυξάνεται στα μεταβατικά-transitional T1 B-κύτταρα (κυρίως στα ώριμα B-λεμφοκύτταρα) και μεγιστοποιείται μετά την ενεργοποίηση του B κυττάρου (παρουσία αντιγόνου). Έπειτα, κατά τα στάδια διαφοροποίησης των ενεργοποιημένων B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, η έκφραση του TACI μειώνεται και αυξάνεται ο BCMA και το μόριο APRIL είναι υπεύθυνο για την επιβίωση των πλασματοκυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων.

3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ TACI ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΤΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η πρωτεΐνη TACI παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του B κυττάρου. Συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση του B κυττάρου. Ωστόσο, μελέτες

έχουν δείξει ότι ο κυτταρικός υποδοχέας TACI παίζει άλλοτε θετικό και άλλοτε ανασταλτικό ρόλο ανάλογα τις συνθήκες [124].

Από την μία πλευρά συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην επιβίωση και την ισοτυπική μεταστροφή των B κυττάρων. Το γεγονός ότι ο υποδοχέας TACI υπερεκφράζεται μετά από ενεργοποίηση του B κυττάρου, οδήγησε στη διαπίστωση ότι παίζει κομβικό ρόλο στην ισοτυπική μεταστροφή και στην ωρίμανση της χυμικής συγγένειας. Η επιβεβαίωση ήρθε αργότερα όταν η διέγερση του υποδοχέα μετά από τη σύνδεση με το μόριο APRIL, παρουσία πρωτεογλυκανών οδήγησε στην παραγωγή IgA ανοσοσφαιρίνης. Επίσης παίζει ρόλο στην επιβίωση των πλασματοκυττάρων και στην παραγωγή αντισωμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της BLIMP-1, μία πρωτεΐνη που συμμετέχει στη τελική διαφοροποίηση του B κυττάρου προς πλασματοκύτταρο. Επίσης, αυτό επιτυγχάνεται και μέσω αποικοδόμησης και καταστολής της πρωτεΐνης BIM (προ-αποπτωτική πρωτεΐνη των πλασματοκυττάρων) [125].



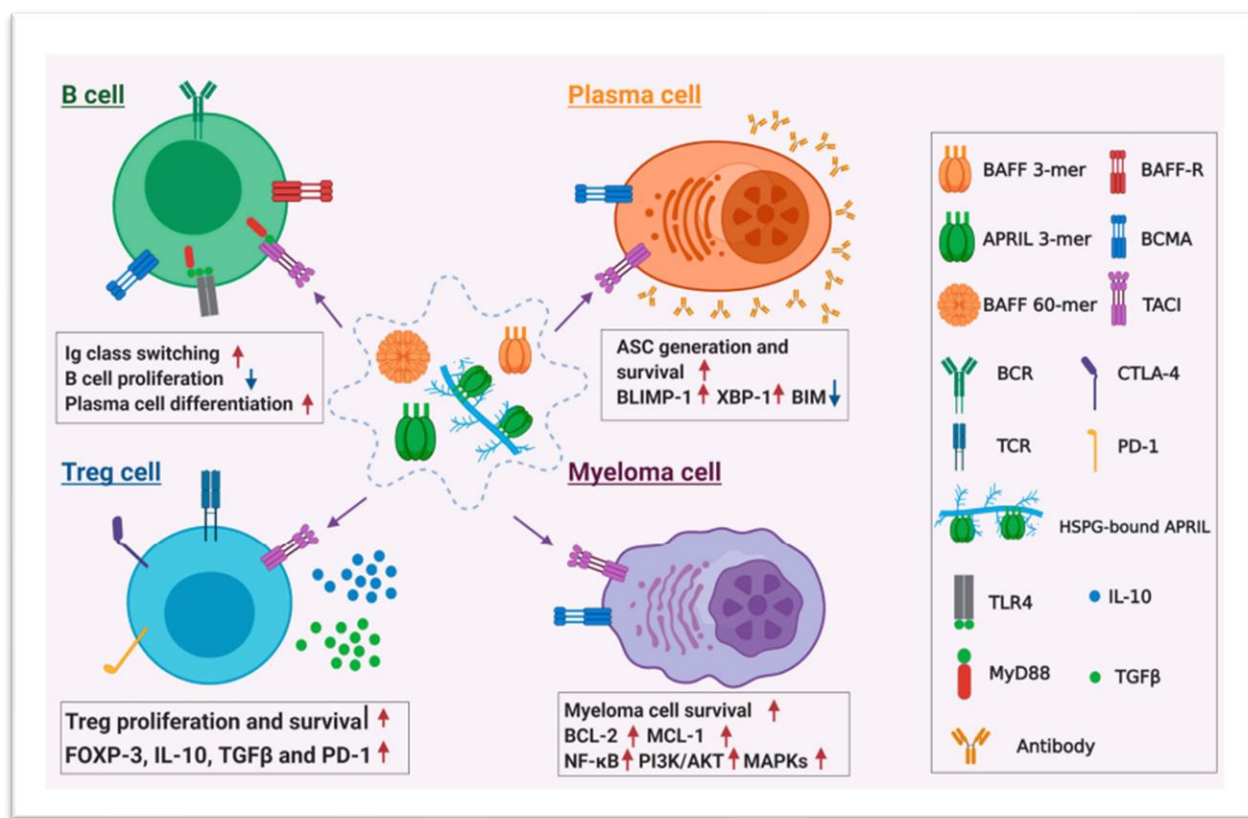
Εικόνα 2: Γονιδιακή οργάνωση και δομή πρωτεΐνης TACI:

α) Το γονίδιο αποτελείται από 5 εξόνια. Οι CRD-1 και CRD-2 περιοχές στο εξωκυττάριο τμήμα του κυτταρικού υποδοχέα. Τα μόρια BAFF και APRIL είναι οι κύριοι συνδέτες του TACI

β) Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα ενεργοποιούνται τα μονοπάτια NF-AT και NF-κβ.

(από Bacchelli και συν. [124])

Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη TACI έχει και αρνητικές επιδράσεις αναστέλλοντας την επέκταση των B κυττάρων μέσω απόπτωσης. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια (TACI^{-/-}) έδειξαν ότι αυτά εμφανίζουν σε μεγάλο ποσοστό λεμφουπερπλασία και αυτοανοσία, καθώς παρατηρήθηκαν περιπτώσεις σπληνομεγαλίας, λεμφωμάτων και αυτοάνοσων εκδηλώσεων. Παράλληλα, η απουσία της έκφρασης της πρωτεΐνης οδήγησε σε διαταραχή της θυμοανεξάρτητης παραγωγής ανοσοσφαιρινών (σε απόκριση σε πολυσακχαριτιδικά αντιγόνα, τη στιγμή που οι T εξαρτώμενες απαντήσεις παρέμειναν ανέπαφες).



Εικόνα 3: Λειτουργίες κυτταρικού υποδοχέα TACI. Ο ρόλος του κυτταρικού υποδοχέα TACI, στη κυτταρική σηματοδότηση. α) Παρόλο που διαλυτά ομοτριμερή BAFF / APRIL συνδέονται με τον υποδοχέα TACI, αυτό δεν αρκεί για την ενεργοποίησή του. Για αυτό είναι απαραίτητος ο πολυμερισμός σε 60μερή μορίου BAFF και το σύμπλεγμα APRIL με πρωτεογλυκάνες. β) οι δύο ισομορφές του κυτταρικού υποδοχέα γ) διεγερτικά και ανασταλτικά σήματα που επηρεάζουν την έκφραση και ενεργοποίηση του υποδοχέα δ) διαλυτοί υποδοχείς TACI, επίδραση μεταλλοπρωτεάσης ADAM17 ε) ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης στ) TACI γενετικοί στόχοι, από Shengli Xu et al. Βιβλ. 127.

Μια πιθανή εξήγηση για την εμφάνιση αυτοανοσίας και λεμφοϋπερπλασίας βασίζεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη TACI ανταγωνίζεται το μόριο BAFF στην πρόσδεση με τον υποδοχέα BAFFR. Οπότε σε κανονικές συνθήκες εξασφαλίζεται ισορροπία. Επί απουσίας όμως του TACI, υπερισχύει η σύνδεση του μορίου BAFF με αυξημένη σηματοδότηση του BAFFR, που οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των B κυττάρων σε λεμφοϋπερπλασία και ενεργοποίηση αυτοδραστικών B κλώνων [126][127].

3.3 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B/TACI*

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα TACI ενισχύει τις TI (T cells independent) απαντήσεις και τη διαφοροποίηση και επιβίωση των πλασματοκυττάρων. Μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* σε ομόζυγη, ετερόζυγη και διπλά ετερόζυγη μορφή έχουν συνδεθεί με την ΚΠΑ, αλλά σε ένα 1-2% ανευρίσκονται και σε υγιή πληθυσμό. Οικογενειακή συρροή αναφέρεται σε ένα 10-20% των ασθενών με ΚΠΑ και γενετικές βλάβες ανευρίσκονται σε ένα 10-20% ασθενών με ΚΠΑ και IgA ανεπάρκεια. Οι γενετικές βλάβες του γονιδίου σχετίζονται με αυξημένο ποσοστό αυτοανοσίας και ιδιαίτερα αυτοάνοσων κυττοπενιών και σπληνομεγαλίας [128][129]. Οι πρώτες μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B* που συνδέθηκαν αιτιοπαθογενετικά με την ΚΠΑ περιγράφηκαν το 2003. Ωστόσο 2-3 χρόνια αργότερα τα ίδια κέντρα αναθεώρησαν αυτή την αιτιοπαθογενετική σχέση, καθώς οι ίδιες γενετικές βλάβες ανιχνεύθηκαν και σε υγιή άτομα. Το γονίδιο *TNFRSF13B* χαρακτηρίζεται από ποικίλη διεισδυτικότητα [130][131]. Οι A181E και η C104R αποτελούν τις πιο συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου (70-80%). Οι μεταλλάξεις αυτές φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση και τη λειτουργία του υποδοχέα ακόμα και σε ετερόζυγη μορφή, για το λόγο αυτό συνδέονται ισχυρά με τη νόσο. Η C104R εντοπίζεται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα και παρεμποδίζει τη σύνδεση των μορίων BAFF και APRIL, διαταράσσοντας το δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ Cys93 και Cys104 και παρεμποδίζει τη δημιουργία του h2 βρόγχου. Η πιο σπάνια μετάλλαξη 187N προκαλεί παρόμοιες διαταραχές στον κυτταρικό υποδοχέα [132][133]. Από την άλλη πλευρά η μετάλλαξη A181E εντοπίζεται στο διαμεμβρανικό τμήμα του υποδοχέα και αναστέλλει την ενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος ενδοκυττάρια (ενεργοποίηση NF-AT και NF-κβ) αφού έχουν συνδεθεί ήδη οι συνδέτες. Άλλες μεταλλάξεις που επιδρούν στη λειτουργία του υποδοχέα με παρόμοιο τρόπο είναι οι K188M και E236Ter. Χαρακτηριστικά, στον ελληνικό πληθυσμό έχουν περιγραφεί τόσο

μεταλλάξεις που σχετίζονται αιτιοπαθογενετικά με τη νόσο (R20C και η C62Y113) όσο και πολυμορφισμοί που δεν σχετίζονται με την αιτιοπαθονένεια της ΚΠΑ (non causative, polymorphic variant) όπως V220A, P251L, T27, P97, S277 και οι πολυμορφισμοί (A24625C, T33402G και T33482C) που εντοπίζονται σε περιοχές εσονίων [133][134].

Νουκλεοτίδιο	Μετάλλαξη (πρωτεΐνη)	Τμήμα υποδοχέα	Ασθενείς (%)	Υγιείς (%)
61+1G>T	-	Ιντρόνιο 1	2,10	0
81G>A	T27T	CRD1, εξωκυττάριο	72,60	40,30
118T>C	W40R	CRD1, εξωκυττάριο	<0,40	0
121G>C	D41H	CRD1, εξωκυττάριο	0,94	0
124C>A	P42T	CRD1, εξωκυττάριο	2,10	0,40
204insA	L69fsX11	CRD1, εξωκυττάριο	0,47	0
215G>A	R72H	CRD2, εξωκυττάριο	0,94	0
236A>G	Y79C	CRD2, εξωκυττάριο	<0,40	0
260T>A	I87N	CRD2, εξωκυττάριο	<0,40	0,15
291T>G	P97P	CRD2, εξωκυττάριο	6,13	1,61
310T>C	C104R	CRD2, εξωκυττάριο	1,66-4,60	0-2,52
324G>A	C104Y	CRD2, εξωκυττάριο	<0,40	0
445G>A	A149T	Εξωκυττάριο	<0,40	0
455G>A	G152E	Εξωκυττάριο	<0,40	0
492C>A	Y164X	Εξωκυττάριο	<0,40	ΔΕ
512T>G	L171R	Διαμεμβρανικό	0,47	0
515G>A	C172Y	Διαμεμβρανικό	2,10	0
542C>A	A181E	Διαμεμβρανικό	0-2,60	0-1
563A>T	K188M	Ενδοκυττάριο	1,0	ΔΕ
579C>A	C193X	Ενδοκυττάριο	<0,40	<0,40
605G>A	R202H	Ενδοκυττάριο	0-3,54	0-2,31
659T>C	V220A	Ενδοκυττάριο	3,30	0,80
736G>T	V246F	Ενδοκυττάριο	<0,40	0
752C>T	P251L	Ενδοκυττάριο	7,07-17	10,48
831T>C	S277S	Ενδοκυττάριο	32,07	25,80

Εικόνα 4: Μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, τροποποίησις πίνακα από Salzer et al. Βιβλ.126

Εκτός της ΚΠΑ και γενικότερα των ΠΑΑ, μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* έχουν αναφερθεί και σε πλήθος άλλων νοσημάτων αυτοάνοσων και μη όπως σε Συστηματικό Ερυθηματώδη, Υπερτροφία Αμυγδαλών, Σαρκοείδωση, Υπερτροφία Αδενοειδών Εκβλαστήσεων [135][136][137][138]. Η πρώτη διαπίστωση ότι ασθενείς με ΚΠΑ και με μεταλλάξεις του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* εμφανίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό αυτοάνοσες κυτταροπενίες και λεμφοϋπερπλασία έγινε από τους Zhang et al και Salzer.. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B* επιδρούν άμεσα στη λειτουργία των Β κυττάρων in vitro, αλλά δεν οδηγούν απαραίτητα σε ανοσοανεπάρκεια in vivo [139].

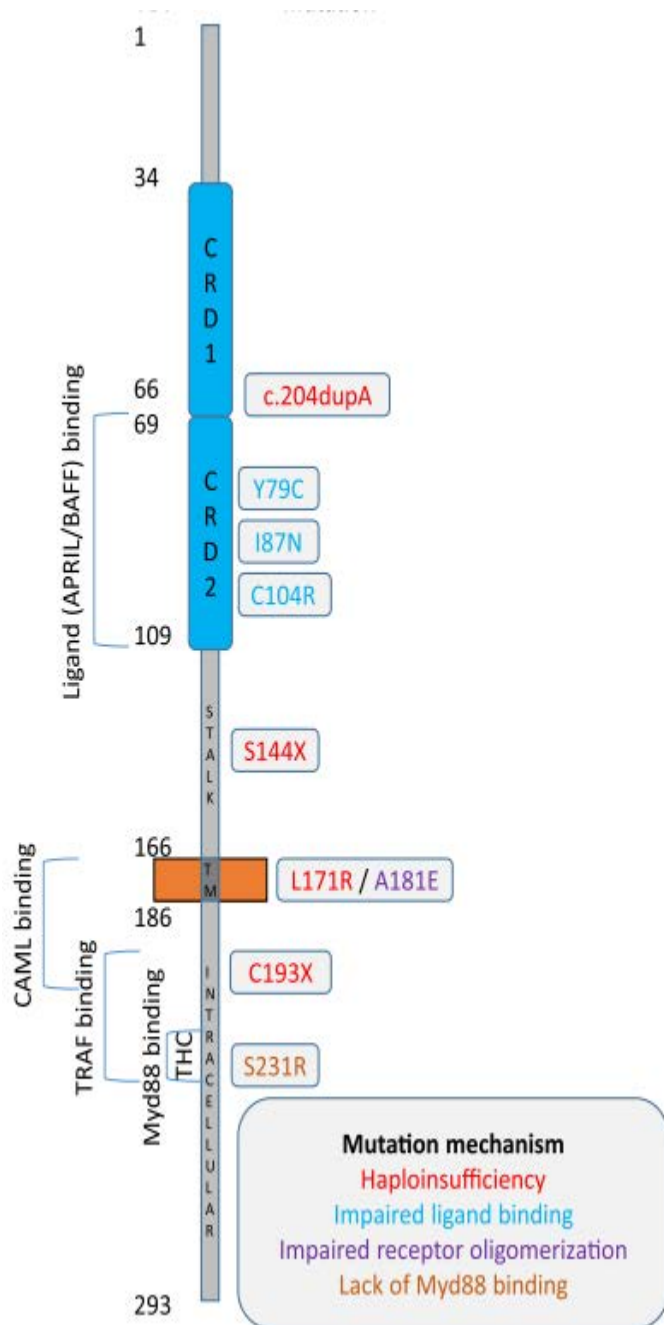
Οι Salzer και συν. προτείνουν ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο σε ετερόζυγη κατάσταση είναι δυνητικά επαγωγείς της νόσου και προδιαθέτουν την εμφάνιση ΚΠΑ, ενώ οι διπλά ετεροζυγώτες εμφανίζουν τη νόσο [140]. Παρόλα αυτά, υπάρχουν κλινικά υγιή άτομα με γενετικές βλάβες και στα 2 αλληλία, με ήπια μειωμένα επίπεδα ανοσοσφαιρινών ορού τα οποία δεν εμφανίζουν κλινικό φαινότυπο της νόσου [141].

Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα στη βιβλιογραφία που να μελετούν τη συσχέτιση των γενετικών αυτών βλαβών του *TNFRSF13B/TACI* με ανεπάρκεια των υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών.

Μελέτη του εργαστηρίου μας όπου συμμετείχαν 47 συνολικά ασθενείς (16 με ΚΠΑ και 16 με ανεπάρκεια IgA, 11 με ανεπάρκεια IgG4 και 4 με παροδική υπογαμμασφαιριναιμία της βρεφικής ηλικίας), έδειξε υψηλή συχνότητα γενετικών βλαβών (18.8%) του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με sIgG4d. Συγκεκριμένα, αξίζει να σημειωθεί ότι η γενετική βλάβη p.L69TfsX12 που ανιχνεύθηκε σε ασθενείς με μεμονωμένη ανεπάρκεια της IgG4 επιδρά στη λειτουργία της πρωτεΐνης TACI [142].

Μελέτες έχουν δείξει ότι *TACI*^{-/-} διαγονιδιακά ποντίκια, εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα όλων των υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών μετά από εμβολιασμό με πολυσακχαριτιδικά αντιγόνα [143]. Παρόμοια συσχέτιση αναφέρεται σε μελέτες με ποντίκια, όπου η αντίστοιχη μετάλλαξη C104R του ανθρώπινου είδους, οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα υποτάξεων IgG1,2. Οι προηγούμενες διαπιστώσεις, ενισχύουν την επίδραση και σημασία του γονιδίου στην ανεπάρκεια των υποτάξεων, εάν σκεφτούμε και την συμμετοχή του κυτταρικού υποδοχέα TACI στην ισοτυπική μεταστροφή των ανοσοσφαιρινών.

Πρόσφατες μελέτες σε *in vivo* και *in vitro* TACI-deficient μοντέλα, αποκάλυψαν νέες λειτουργίες της πρωτεΐνης όπως η συμμετοχή στο μονοπάτι των TLRs, στην διαφορετική έκφραση των ισομορφών του υποδοχέα TACI και στην παραγωγή αυτοδραστικών Β κυττάρων. Η πρωτεΐνη TACI παίζει σημαντικό ρόλο στη κεντρική ανοχή των Β κυττάρων. Αυτό επιβεβαιώνεται από μελέτες όπου ασθενείς με μεταλλάξεις C104R, A181E δεν είχαν την



Εικόνα 5: Γενετικές βλάβες του γονιδίου TACI και η θέση τους στην δομή του υποδοχέα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι, ασθενείς με αυτοάνοσο αιματολογικό νόσημα παρουσιάζουν χαμηλές τιμές της ανοσοσφαιρίνης IgG4, χωρίς εμφανή υπογαμμασφαιριναιμία καθώς και ασθενείς με εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG4 εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* σε υψηλό ποσοστό. Μεταλλάξεις του *TNFRSF13B/TACI* ανευρίσκονται στο 10% περίπου ασθενών με ΠΑΑ. Με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα, σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων σε ασθενείς με αυτοάνοσες κυτταροπενίες και η περαιτέρω γενετική ανάλυση του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*. Για το λόγο αυτό αναλύσαμε και αναδρομικά ασθενείς με αιματολογική αυτοανοσία και ελέγξαμε τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων τους στον ορό και έπειτα σε περιπτώσεις όπου βρήκαμε ανεπάρκεια υποτάξεων (IgG4) προχωρήσαμε σε αλληλούχιση του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*. Δεν αναλύσαμε ασθενείς με βαριά εμφανή υπογαμμασφαιριναιμία, καθώς σκοπός ήταν η μελέτη ασθενών με ανεπάρκεια υποτάξεων που είχαν φυσιολογικό προφίλ των τάξεων των ανοσοσφαιρινών. Δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες στη βιβλιογραφία που να συσχετίζουν τις αυτοάνοσες κυτταροπενίες με υπόστρωμα ανοσοανεπάρκειας και με γενετικές βλάβες ανοσογονιδίων όπως το *TNFRSF13B/TACI*.

2. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η συλλογή των ασθενών έγινε κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2022-Δεκέμβριο 2023 από το αρχείο της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, ενώ στη μελέτη συμμετείχαν και ασθενείς από την Αιματολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Παπαγεωργίου και από το Παιδο-Αιματολογικό τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ. Στη μελέτη συμμετείχαν ασθενείς με επιβεβαιωμένη διάγνωση αυτοάνοσης κυτταροπενίας (Ιδιοπαθής Αυτοάνοση Θρομβοπενία -ΙΑΘ, Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία- AAA, σύνδρομο Evans). Κριτήρια διάγνωσης της ΙΑΘ σύμφωνα με τις επίσημες

κατευθυντήριες οδηγίες ήταν, τιμή των αιμοπεταλίων $PLT < 100 \times 10^3 / \mu L$ με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές αίματος να είναι φυσιολογικές και αποκλεισμός άλλων αιτιών θρομβοπενίας. Η νόσος ταξινομήθηκε ανάλογα με τη διάρκεια της θρομβοπενίας σε νεοδιαγνωσμένη < 3 μήνες, σε εμμένουσα 3-12 μήνες και σε χρόνια > 12 μήνες. Σε όλους τους ασθενείς έγινε καταγραφή των δημογραφικών στοιχείων, ηλικία διάγνωσης, ατομικό και οικογενειακό ιστορικό, ιστορικό αυτοανοσίας και ιστορικό λοίμωξης ή εμβολιασμού πριν την εμφάνιση της νόσου. Ως ηλικία διάγνωσης ορίστηκε η πρωτοδιάγνωση της νόσου, ενώ η μέτρηση των ανοσοσφαιρινών σε πολλές περιπτώσεις έγινε μεταγενέστερα της διάγνωσης. Για αυτό το λόγο καταγράφηκε και η ηλικία μέτρησης των ανοσοσφαιρινών, ώστε να καθοριστούν τα όρια των φυσιολογικών τιμών με βάση την ηλικία και το φύλο των ασθενών. Αναδρομικά αναζητήθηκαν από τον ιατρικό φάκελο των ασθενών τα εργαστηριακά ευρήματα στη διάγνωση της νόσου, όπως αιμοπετάλια διάγνωσης καθώς και τη θεραπεία που έλαβαν. Οι θεραπευτικές επιλογές των ασθενών με ΙΑΘ ταξινομήθηκαν σε περιπτώσεις που δεν χρειάστηκαν θεραπεία και σε περιπτώσεις που έλαβαν θεραπεία πρώτης ή/και δεύτερης γραμμής.

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν, ασθενείς με ιστορικό ΚΠΑ και ALPS (Autoimmune Lymphoproliferative syndrome), ασθενείς με βαριά υπογαμμασφαιριναιμία ($IgG < 400 \text{ mg/dl}$), ασθενείς που λαμβάνουν στη φάση της συλλογής ανοσοκατασταλτική θεραπεία για μεγάλο χρονικό διάστημα (εκτός εάν πρόκειται για ασθενείς που βρίσκονται σε σταδιακή μείωση της χορήγησης κορτικοειδών, ή έχουν διακόψει την ανοσοκατασταλτική θεραπεία τουλάχιστον προ 6 μηνών), ασθενείς που έχουν λάβει γ-σφαιρίνη σε διάστημα 2 μηνών από τη συλλογή του δείγματος και ασθενείς που έχουν λάβει ριτουξιμάμπη. Ως εκλεκτική ανεπάρκεια των υποτάξεων της IgG ορίστηκε η τιμή κάτω από 2 σταθερές αποκλίσεις από τη μέση τιμή για το φύλο και την ηλικία, με φυσιολογικά επίπεδα των υπολοίπων τάξεων.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε λήψη περιφερικού αίματος σε σωληνάριο γενικής αίματος με αντιπηκτικό K3EDTA και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου ή στους $4^\circ C$ και λήψη περιφερικού αίματος σε σωληνάριο βιοχημικού ελέγχου το οποίο φυγοκεντρήθηκε εντός 1-2 ωρών στις 3.000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και

χρησιμοποιήθηκε για ανοσονεφελομετρία με σκοπό την ποσοτική μέτρηση των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων. Στους ασθενείς όπου βρήκαμε ανεπάρκεια υποτάξεων προχωρήσαμε σε αλληλούχιση του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* με τη μέθοδο Sanger.

3.1 ΑΝΟΣΟΝΕΦΕΛΟΜΕΤΡΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΤΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Ο νεφελομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα διάφορα διαλύματα είναι μία εξαιρετικά ακριβής μέθοδος που βασίζεται στη σχέση της τελευταίας με την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός από τα συμπλέγματα που σχηματίζονται μεταξύ της πρωτεΐνης (αντιγόνου) και του προστιθέμενου αντιορού. Τα συμπλέγματα αυτά έχουν μέγεθος της τάξεως των 40-400 nm περίπου, δηλαδή ίσο ή μεγαλύτερο του ενός δεκάτου του μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός και κατά συνέπεια προκαλούν σκεδασμό τύπου Rayleigh-Debye. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στις διάφορες κινητικές νεφελομετρικές μεθόδους εκτιμάται ως συνάρτηση του ρυθμού μεταβολής της έντασης του σκεδασμού στη διάρκεια σχηματισμού των συμπλεγμάτων πρωτεΐνης-αντιορού. Αρχικά, πραγματοποιείται αραίωση του δείγματος με ειδικό διάλυμα και έπειτα χρήση αντιορών με ειδικότητα έναντι της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με συγκεκριμένη καμπύλη αναφοράς. Οι καμπύλες αναφοράς (references curve) σχηματίζονται ως συνάρτηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός και της γνωστής συγκέντρωσης της υπό εξέτασης πρωτεΐνης στα πρότυπα διαλύματα [148].

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Σε ασθενείς με ανεπάρκεια των υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών προχωρήσαμε σε απομόνωση του DNA από ολικό περιφερικό αίμα με σκοπό την περαιτέρω γενετική αλληλούχιση με τη μέθοδο Sanger. Η απομόνωση του DNA έγινε από ληφθέν περιφερικό αίμα, σε σωληνάρια γενικής αίματος με αντιπηκτικό K3EDTA, με την χρήση EXTRACTME GENOMIC DNA EM13 KIT, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Blirt). Πηγή DNA αποτέλεσαν τα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος, για αυτό και το πρώτο βήμα

αποτελέσει η λύση και απομάκρυνση των ερυθρών κυττάρων. Αρχικά, σε ειδικό σωληνάριο φυγοκέντρωσης των 1,5mL, εναποτέθηκαν 200μL ολικού περιφερικού αίματος και 1mL διαλύματος λύσης ερυθρών κυττάρων (RBC Lysis Buffer). Ακολούθησε ήπια ανάδευση του διαλύματος και αναμονή για περίπου 5 min, έως την πλήρη λύση των ερυθρών. Μετά το μίγμα φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα 8.600 x g για 4 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με προσθήκη διαλύματος GL Buffer (Blirt). Στη συνέχεια προστέθηκε 4μl RNAασης A και ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 10 min. Το ένζυμο αυτό αποτελεί μια ενδοριβονουκλεάση, που έχει στόχο την αποικοδόμηση και απομάκρυνση του RNA. Ακολούθησε προσθήκη 10μL πρωτεϊνάσης K με επώαση στους 55°C για 30 min. Το ένζυμο αυτό αποτελεί μία πρωτεάση της σερίνης που διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς και αναστέλλει τις ενδονουκλεάσες, αποτρέποντας τη διάσπαση και κατακρήμνιση του DNA. Σκοπός του ενζύμου είναι η απομάκρυνση κυτταρικών και ιστονικών πρωτεϊνών προσδεμένων στο DNA, μέσω της πέψης πεπτιδικών δεσμών σε αλειφατικά, αρωματικά και υδρόφοβα αμινοξέα. Στη συνέχεια μετά την επώαση ακολούθησε προσθήκη 400μL διαλύματος GB Buffer (Blirt), ήπια ανάδευση σε vortex μέχρι το μίγμα να ομογενοποιηθεί. Το διάλυμα αυτό, περιέχει άλατα υψηλής ιοντικής ισχύος, που κάνουν το DNA πιο υδρόφοβο διασπώντας δεσμούς DNA με μόρια H₂O και αιθανόλη που απομακρύνει τα μόρια H₂O. Έτσι, το DNA καθιζάνει σαν λευκή κλωστή μέσα από υδάτινη μορφή καθώς είναι μη διαλυτό σε αιθανόλη. Έπειτα, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 2 min με ταχύτητα 13.000 x g και το υπερκείμενο που προέκυψε μεταφέρθηκε σε στήλη με σωληνάρια συλλογής υγρού (collection tube). Το περιεχόμενο της στήλης φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα 13.000 x g για 1 min και έπειτα ο σωλήνας συλλογής απορρίφθηκε. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής. Ακολούθησαν 2 πλύσεις της στήλης με τα διαλύματα GW1 (600μL) και GW2 (500μL) στις 13.000 x g για 30 sec και στις 13.000 x g για 30 sec, αντίστοιχα. Τα διαλύματα αυτά μέσω των αλάτων τους, προκαλούν αλλαγή του pH ώστε να διασφαλίσουν την απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων υλικών που πιθανόν να παρεμποδίσουν την PCR και άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής είναι η βελτίωση της ποιότητας του DNA. Έπειτα, αφού το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής απορρίφθηκε, ακολούθησε φυγοκέντρωση με ταχύτητα 16.000 x g για 2 min. Τέλος, η στήλη μεταφέρθηκε στο τελικό σωλήνα αποθήκευσης. Προστέθηκαν σε κάθε στήλη 100μL διαλύματος έκλουσης AE (Elution Buffer), ακολούθησε επώαση 5 min και τελική φυγοκέντρωση στις 13.000 x g για 1min. Η συγκέντρωση του DNA ήταν περίπου 30-100ng/μL.

Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, αποθηκεύτηκαν μέχρι την χρήση τους σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

3.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B/TACI*

3.3.1 PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B/TACI*

Πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση των πέντε εξονίων του γονιδίου με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR. Επιλέχθηκαν πρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές από τη διεθνή βιβλιογραφία, οι οποίοι παρατίθενται παρακάτω.

ΕΞΟΝΙΟ 1

	5' – 3'	PCR προϊόν (bp)
ΠΡΟΣΘΙΟΣ	GGGTGTGGCTGATTACATCC	340
ΟΠΙΣΘΙΟΣ	CCAGAGGCATCCAGACTCG	

ΕΞΟΝΙΟ 2

	5' – 3'	PCR προϊόν (bp)
ΠΡΟΣΘΙΟΣ	AAAGGTTGTCTGTGCGAATGT	319
ΟΠΙΣΘΙΟΣ	CCAGAGGGTGCTCTAGGAG	

ΕΞΟΝΙΟ 3

	5' – 3'	PCR προϊόν (bp)
ΠΡΟΣΘΙΟΣ	ATCAAAATGCAATGCAGCTAAA	635
ΟΠΙΣΘΙΟΣ	AGACTTCTGGAAATGTTGCCTA	

ΕΞΟΝΙΟ 4

	5' – 3'	PCR προϊόν (bp)
ΠΡΟΣΘΙΟΣ	GGGGGAGTGGATCAAC	540
ΟΠΙΣΘΙΟΣ	GTCTGCCAGGATGTCTTAACC	

ΕΞΟΝΙΟ 5

	5' – 3'	PCR προϊόν (bp)
ΠΡΟΣΘΙΟΣ	TGGCAGACAGATAACT	717
ΟΠΙΣΘΙΟΣ	CTCTCTCCTCATATATCTCTC	

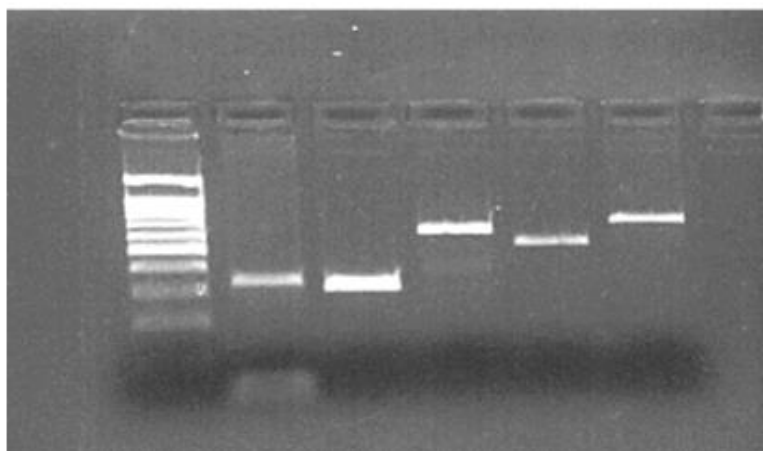
Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 100–200ng DNA, 210 $\mu\text{mol/L}$ από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1.02 μmol από τον κάθε εκκινητή, 1.52 mmol/L MgCl_2 και 0.04 U/ μL του ενζύμου Taq πολυμεράση. Ο τελικός όγκος του μείγματος της αντίδρασης ήταν 30 μL . Στον Πίνακα 3 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου της αντίδρασης (αποδιάταξη, υβριδισμός, επιμήκυνση) καθώς και το μήκος των τελικών προϊόντων.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής Veriti 96 Well Thermacycler (Applied Biosystems) και ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο ως μάρτυρας με απεσταγμένο ύδωρ, αντί γενετικού υλικού. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η περιγραφή των συγκεκριμένων διαδικασιών ακολουθεί.

ΕΞΟΝΙΟ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR	PCR ΠΡΟΙΟΝ
1	94°C για 2 min αποδιάταξη-υβριδισμό, ακολουθούμενη από 31 κύκλους (94°C για 30s, 62 °C για 30s, 72 °C για 30s) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min	340 bp
2	94°C για 2 min, αποδιάταξη-υβριδισμό, ακολουθούμενη από 30 κύκλους (94°C για 30s, 64 °C για 30s, 72 °C για 30s) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min	319bp
3	94°C για 2 min, αποδιάταξη-υβριδισμό, ακολουθούμενη από 31 κύκλους (94°C για 30s, 62 °C για 30s, 72 °C για 30s) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min	635bp
4	94°C για 2 min , αποδιάταξη-υβριδισμό, ακολουθούμενη από 35 κύκλους (94°C για 30s, 60 °C για 30s, 72 °C για 30s) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min	540bp
5	94°C για 2 min, αποδιάταξη-υβριδισμό, ακολουθούμενη από 30 κύκλους (94°C για 30s, 55°C για 30s, 72 °C για 30s) και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min	717bp

3.3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B/TACI* ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρησή σε γέλη αгарόζης 2%. Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (5 μ L δείγματος, 1 μ L χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30 min. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών βαρών ο 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Israel) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems). Στην Εικόνα 6 που ακολουθεί, παρουσιάζεται το αποτέλεσμα μιας αντιπροσωπευτικής ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR για τα πέντε exons του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*.



Εικόνα 6: Ενίσχυση ηλεκτροφόρησης των πέντε εξονίων του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*.

Κατά σειρά ladder, εξόνιο 1 (340bp), εξόνιο 2 (319bp), εξόνιο 3 (635bp), εξόνιο 4 (540bp) και εξόνιο 5 (717bp)

3.3.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B/TACI*

Η τυχόν παρουσία μεταλλάξεων ή και πολυμορφισμών στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* ελέγχθηκε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing), μετά από «καθαρισμό» των προϊόντων PCR. Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR έγινε με τη χρήση του GRS PCR AND GEL BAND PURIFICATION KIT (Grisp). Η χρήση συστημάτων «κάθαρσης» αποσκοπεί στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων. Βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο. Ακολουθεί περιγραφή του πρωτοκόλλου της Grisp. Η διαδικασία περιλαμβάνει την προσθήκη καθαρού αποσταγμένου ύδατος σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR σε όγκο διπλάσιο από τον αρχικό όγκο (π.χ. σε όγκο PCR προϊόντος 25μL προστίθεται αποσταγμένο νερό 25μL, με τελικό όγκο 50μl). Έπειτα, προστίθεται NTI Buffer σε όγκο διπλάσιο από τον τελικό όγκο του διαλύματος, άρα 100μl και ακολουθεί ήπια ανάδευση και κατόπιν μεταφορά σε ειδικές στήλες με ειδικά σωληνάρια αποθήκευσης (collection tube) για την προσρόφηση του DNA. Μετά από φυγοκέντρηση στις 11.000 x g για 30 sec και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης, ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 700 μL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (NT3 Buffer). Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 x g για 30sec και έπειτα ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση (11.000 x g για 1 min) χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την στήλη. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 22 μL διαλύματος έκλουσης (Ellution Buffer NE) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 x g για 1 min. Τα «κεκαθαρμένα» προϊόντα PCR ανακτώνται σε τελικό όγκο περίπου 28 μl, ενώ αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας τους.

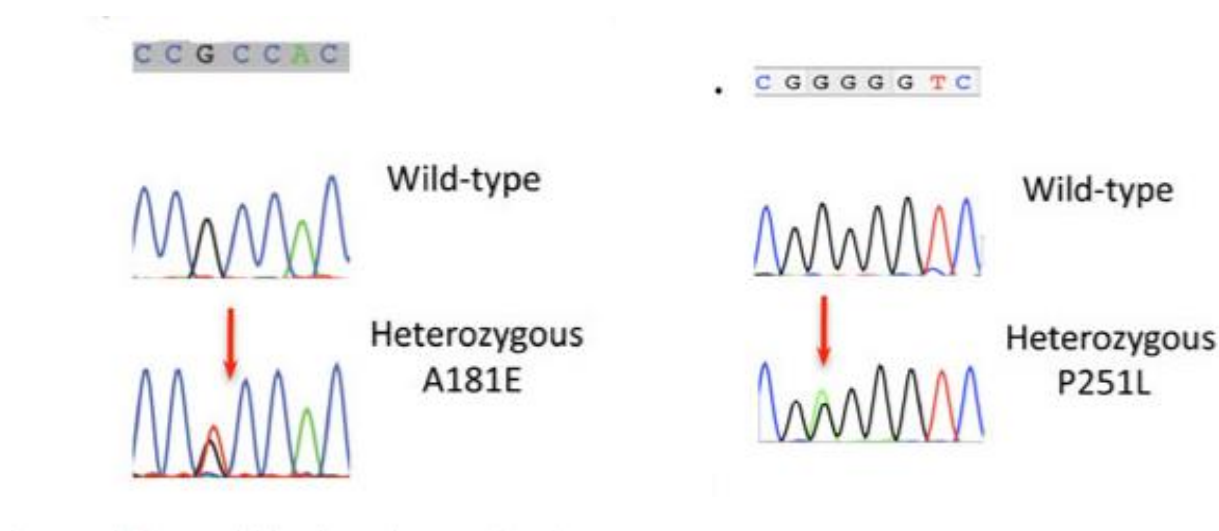
3.3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *TNFRSF13B/TACI* ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ SANGER

Η μέθοδος Sanger είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA που βασίζεται στην τυχαία ενσωμάτωση τερματικών διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs) από την DNA πολυμεράση κατά την in vitro αντιγραφή του DNA. Ανακαλύφθηκε από τον Frederick

Sanger το 1977 και ήταν για αρκετές δεκαετίες η επικρατέστερη μέθοδος αλληλούχησης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση των ddNTPs, τα οποία είναι τροποποιημένα dNTPs που στο 3' άκρο τους έχει αντικατασταθεί το υδροξύλιο με υδρογόνο και αυτό οδηγεί στην αδυναμία σχηματισμού φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο dNTP κατά τη σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Επομένως, όταν προστίθεται ένα ddNTP διακόπτεται η σύνθεση της αλυσίδας του DNA. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας παράγονται όλα τα πιθανά μεγέθη του αρχικού προϊόντος. Παλαιότερα, λόγω ότι τα ddNTPs ήταν σημασμένα με ραδιενέργεια, η Sanger πραγματοποιούνταν σε τέσσερις αντιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, η σήμανση γινόταν αρχικά με ^{32}P και έπειτα σε μία προσπάθεια βελτίωσης της μεθόδου αντικαταστάθηκε με ^{35}S (η οποία απέδιδε πιο έντονες ζώνες). Στη συνέχεια, τα θραύσματα DNA που προέκυπταν από τις τέσσερις αντιδράσεις έτρεχαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου. Οι ζώνες του DNA μπορούσαν να παρατηρηθούν με αυτοραδιογραφία ή υπεριώδη ακτινοβολία. Κάθε ζώνη συμβολίζει ένα τμήμα DNA που είναι το αποτέλεσμα του τερματισμού σύνθεσης μίας αλυσίδας μετά τη προσθήκη ενός ddNTP. Τα τμήματα διαφορετικού μεγέθους βρίσκονται σε διαφορετικό ύψος, δηλαδή τα πιο μεγάλα τμήματα στα οποία έχουν προστεθεί και περισσότερα dNTPs βρίσκονται ψηλότερα στο πήκτωμα από ότι τα μικρότερα. Επομένως, αποκαλύπτεται η θέση της κάθε βάσης.

Μία σημαντική εξέλιξη στη μέθοδο ήταν η αντικατάσταση των ραδιοσημασμένων ddNTPs με φθορίζοντα μόρια, με αποτέλεσμα να μην είναι αναγκαίο να λαμβάνουν χώρα τέσσερις αντιδράσεις αλλά μία, που περιέχει και τα τέσσερα ddNTPs, τα οποία είναι σημασμένα με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική το καθένα. Με την αυτοματοποίηση της μεθόδου με τη χρήση γενετικών αναλυτών, γίνεται διαχωρισμός των διαφορετικών τμημάτων DNA με βάση το μέγεθος τους με τη χρήση της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή. Καθώς τα τμήματα DNA περνούν από τα τριχοειδή διεγείρεται η φθορίζουσα χρωστική με την οποία είναι σημασμένα τα ddNTPs και επειδή το μήκος κύματος της κάθε μίας διαφέρει μπορούν να διαχωριστούν. Το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ένα χρωματογράφημα όπου κάθε διαφορετική κορυφή αντιστοιχεί σε διαφορετική φθορίζουσα χρωστική και άρα διαφορετική βάση στη συγκεκριμένη θέση.

Τα «κεκαθαρμένα» προϊόντα PCR αναλύθηκαν με αλληλούχιση βάσεων (sequencing), χρησιμοποιώντας τους οπίσθιους εκκινητές για τα εξόνια 2, 3 και 5, ενώ για τα εξόνια 1 και 4 χρησιμοποιήθηκαν οι πρόσθιοι εκκινητές. Χρησιμοποιήθηκαν ο γενετικός αναλυτής ABI Prism310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και το συνοδό του Big Dye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems). Για την μελέτη των αλληλουχιών με στόχο την ανάδειξη τυχόν μεταλλάξεων ή και πολυμορφισμών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DNA Sequencing Analysis software, version 3.4 (Applied Biosystems) [148][149].



Εικόνα 7: Α. αλληλούχιση βάσεων σε ασθενή ετερόζυγο της μετάλλαξης A181E Β. αλληλούχιση βάσεων σε ασθενή ετερόζυγο του πολυμορφισμού P251L

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στη μελέτη συμμετείχαν 116 ασθενείς με αυτοάνοσες κυτταροπενίες. Σε 8 ασθενείς η διάγνωση έγινε σε παιδική ηλικία (<16 ετών), ενώ στους υπόλοιπους 108 ασθενείς η διάγνωση έγινε στην ενήλικη ζωή.

ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

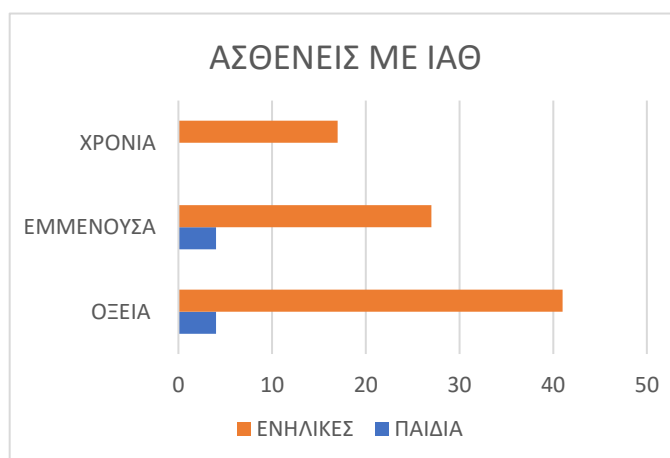
Από τους παιδιατρικούς ασθενείς, 4 ήταν αγόρια (50%) και 4 ήταν κορίτσια (50%). Όλοι διαγνώστηκαν με ΙΑΘ, με μέση ηλικία διάγνωσης 8.8 έτη (εύρος 1.5-16 έτη). Όλοι οι ασθενείς τη στιγμή της διάγνωσης είχαν αιμορραγικές εκδηλώσεις από το δέρμα (πετέχειες και εκχυμώσεις), χωρίς βαριές αιμορραγικές επιπλοκές, με μέση τιμή αιμοπεταλίων διάγνωσης 8.500/ μL . Σε 2 ασθενείς από τους 8, αναφέρεται ιστορικό προηγηθείσας ιογενούς συνδρομής, ενώ σε 1 ασθενή αναφέρεται εκδήλωση της νόσου μετά από πρώτη δόση εμβολίου MMR σε ηλικία 1.5 έτους, συσχέτιση που περιγράφεται στη βιβλιογραφία. Δύο ασθενείς είχαν θετικό ιστορικό αυτοανοσίας (Hashimoto, ψωρίαση) και ένας θετικό οικογενειακό ιστορικό αυτοανοσίας (μητέρα και μητρική γιαγιά με Hashimoto). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλους τους παραπάνω ασθενείς οι τιμές των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων ήταν φυσιολογικές. Σύμφωνα με τη διεθνή ταξινόμηση, 4 ασθενείς είχαν οξεία νόσο (<3 μήνες) και 4 ασθενείς εμμένουσα (3-12 μήνες). Ένας ασθενής δεν χρειάστηκε καμία θεραπεία, ενώ οι υπόλοιποι έλαβαν πρώτης γραμμής θεραπεία με καλή ανταπόκριση

Μέση τιμή επιπέδων ανοσοσφαιρινών: IgG = 1002,6 mg/dl (εύρος 717,0-1870,0 mg/dl), IgA=119,6 mg/dl (εύρος 0-334,0 mg/dl), IgM= 69,7 mg/dl (εύρος 34,0-114,0 mg/dl), IgG1= 684,0 mg/dl (εύρος 429,0-1410,0 mg/dl), IgG2=225,5 mg/dl (εύρος 159,0-342,0 mg/dl), IgG3=48,8 mg/dl (εύρος 22,0-108,0 mg/dl), IgG4= 40,0 mg/dl (εύρος 1,0-121,0mg/dl).

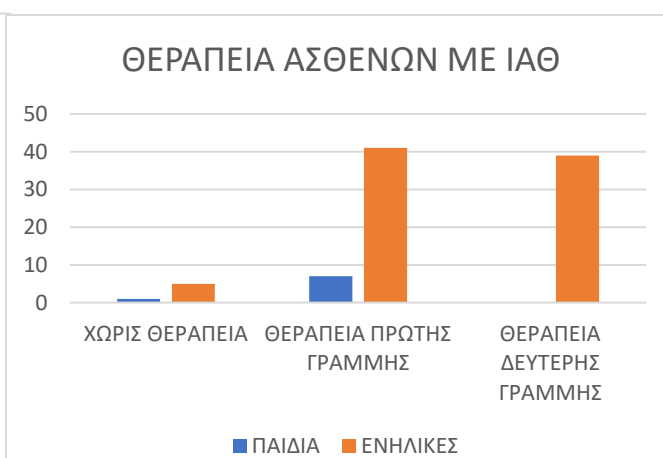
. Σε δύο από τους οκτώ ασθενείς, ανιχνεύσαμε εκλεκτική ανεπάρκεια της ανοσοσφαιρίνης IgG4 με φυσιολογικά επίπεδα IgG, IgM, IgA. Κανείς από αυτούς δεν είχε ιστορικό υποτροπιάζουσων λοιμώξεων, με αρνητικό ατομικό και οικογενειακό ιστορικό. Σε έναν από αυτούς τους ασθενείς προχωρήσαμε σε αλληλούχιση του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI*, όπου ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη A181E (rs725538883) σε ετερόζυγη μορφή. Πρόκειται για μία μετάλλαξη που συνδέεται αιτιοπαθογενετικά με την ΚΠΑ και αποτελεί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τη δεύτερη συχνότερη μετάλλαξη μετά τη C104R. Επίσης, στον ίδιο ασθενή ανιχνεύθηκαν και πολυμορφισμοί του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* σε ετερόζυγη μορφή, που έχουν ήδη περιγραφεί στη βιβλιογραφία. Πρόκειται για τους πολυμορφισμούς T27 (rs8072293) και S277 (rs11078355) οι οποίοι εντοπίζονται σε εξόνια, καθώς και για τον πολυμορφισμό A24625C (rs2274892) που εντοπίζονται σε περιοχές εσονίων.

ΕΝΗΛΙΚΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Από τους 108 ενήλικες ασθενείς, 60 ήταν γυναίκες (55%) και 48 άνδρες (45%). Από αυτούς 97 είχαν διάγνωση ΙΑΘ (89%), 9 ΑΑΑ (8%) και 2 σ. Evans. (3%). Μέση ηλικία διάγνωσης της αυτοάνοσης κυτταροπενίας ήταν τα 54,5 έτη. Συγκεκριμένα για την ΑΑΑ ήταν τα 58,7 έτη, για το σ. Evans τα 68 έτη και για την ΙΑΘ ήταν τα 53,3 έτη. Μέση τιμή αιμοπεταλίων τη στιγμή της διάγνωσης για τους ασθενείς με ΙΑΘ ήταν 10.234/ μ L. Σε 11 ασθενείς (10%) η διάγνωση έγινε μετά από ανεύρεση θρομβοπενίας ή αναιμίας σε τυχαίο έλεγχο, ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς τη στιγμή της διάγνωσης είχαν αιμορραγικές εκδηλώσεις από το δέρμα, τους βλεννογόνους καθώς και αδυναμία, κόπωση. Το 19.4% των ασθενών είχαν θετικό ιστορικό ιογενούς συνδρομής προ της εμφάνισης των συμπτωμάτων. Το 41% των ασθενών με ΙΑΘ είχαν οξεία μορφή, 20% είχαν χρόνια και το 31.7% είχαν εμμένουσα νόσο. Το 14.8% είχαν θετικό ιστορικό αυτοανοσίας. Όσον αφορά τη θεραπεία, δεδομένα είχαμε σε 85 από τους 97 ασθενείς με ΙΑΘ, εκ των οποίων οι 5/85 (5.8%) δεν χρειάστηκε να λάβουν καμία θεραπεία, οι 41/85 (48%) έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής και οι υπόλοιποι 39/85 (45,8 %) έλαβαν και θεραπεία δεύτερης γραμμής



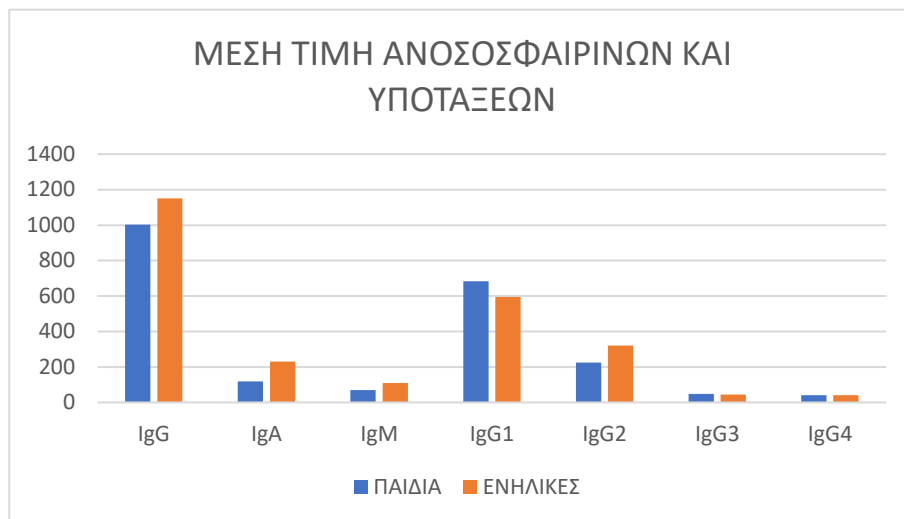
Εικόνα 8: Συχνότητα ΙΑΘ σε ενήλικες και παιδιά



Εικόνα 9: Θεραπευτικές επιλογές ασθενών με ΙΑΘ

Μέση τιμή ανοσοσφαιρινών: IgG = 1151,5 mg/dl (εύρος 545,0-2320,0 mg/dl), IgA=231,4 mg/dl (εύρος 46,0-1030,0 mg/dl), IgM= 110,44 mg/dl (εύρος 25,8-309,0 mg/dl). Στους 68 από τους 108 ασθενείς, έγινε μέτρηση των υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών. Μέση τιμή υποτάξεων: IgG1= 595,5 mg/dl (εύρος 136,0-976,0 mg/dl), IgG2=320,0 mg/dl (εύρος 71,0-532,0 mg/dl), IgG3=45,0 mg/dl (εύρος 17,0-157,0 mg/dl), IgG4= 41,7 mg/dl (εύρος 1,0-98,0mg/dl).

Έξι ασθενείς (8.8%) είχαν εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG4 ανοσοσφαιρίνης με φυσιολογικές τιμές IgG, IgM, IgA. Κανείς από αυτούς δεν είχε ιστορικό υποτροπιάζουσων λοιμώξεων. Τρεις από τους 6 (50%) είχε θετικό ιστορικό αυτοανοσίας και 2 ασθενείς είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό ανοσοανεπάρκειας. Συγκεκριμένα, στην μία περίπτωση αναφέρεται κόρη με ΚΠΑ και μεταλλάξεις στο γονίδιο *IKAPOΣ* και στη δεύτερη περίπτωση ανιψιά με ΚΠΑ.



Εικόνα 9: Μέση τιμή ανοσοσφαιρινών και υποτάξεων σε ενήλικες και παιδιά

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* δεν ανευρέθηκαν σε κανέναν ασθενή, ωστόσο 5/6 ασθενείς εμφάνισαν πολυμορφισμούς του γονιδίου. Πρόκειται για τους πολυμορφισμούς T27 (rs8072293) και S277 (rs11078355) και P251L οι οποίοι εντοπίζονται σε εξόνια, καθώς και για τους πολυμορφισμούς A24625C (rs2274893) και A24625C (rs2274892) που εντοπίζονται σε περιοχές εσονίων. Πιο συγκεκριμένα, οι πολυμορφισμοί T27 και S277 ανιχνεύτηκαν σε 5 ασθενείς με ανεπάρκεια IgG4 σε ετερόζυγη μορφή, ενώ ο A24625C (rs2274893) εμφανίστηκε σε 3 ασθενείς και ο A24625C (rs2274892) σε έναν ασθενή. Τέλος, ένας ασθενής εμφάνισε τον πολυμορφισμό P251L σε ετεροζυγωτία.

Συνολικά, μελετήσαμε 116 ασθενείς παιδιά και ενήλικες. Στους 76 ασθενείς μετρήσαμε υποτάξεις ανοσοσφαιρινών ορού. Σε 8/76 (10,5%) βρήκαμε εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG4. Σε έναν ασθενή ανιχνεύσαμε τη μετάλλαξη A181E και σε 7 από τους 8 ασθενείς ανιχνεύσαμε πολυμορφισμούς του γονιδίου *TACI*. Οι μεταλλάξεις, A181E και C104R, φαίνεται πλέον ότι

συνδέονται ισχυρά με την εμφάνιση της ΚΠΑ και αποτελούν το 70-80% των γενετικών βλαβών του γονιδίου. Σε ότι αφορά την μετάλλαξη A181E, αυτή τροποποιώντας την αλληλουχία της διαμεμβρανικής περιοχής επιδρά αρνητικά στην ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος, μετά την σύνδεση του TACI υποδοχέα με τα πολυμερή των APRIL και BAFF.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μέτρηση των ανοσοσφαιρινών ορού IgG,IgA,IgM αποτελεί σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες βασική εξέταση κατά τον πρωταρχικό έλεγχο ασθενών με αυτοάνοσες κυτταροπενίες. Γνωρίζουμε ότι στο 20% ασθενών με ΚΠΑ εμφανίζονται αυτοάνοσες κυτταροπενίες (πιο συχνή η ΙΑΘ), ενώ από την άλλη πλευρά 1% ασθενών με ΙΑΘ μπορεί να εμφανίσει είτε ΚΠΑ είτε IgA ανεπάρκεια. Οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες αποτελούν την πιο συχνή αυτοάνοση εκδήλωση ασθενών με ΚΠΑ και μπορεί η εμφάνιση τους να προηγείται ακόμα και έτη πριν την εκδήλωση της νόσου. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση των τάξεων των ανοσοσφαιρινών αποτελεί μία πρώτη εκτίμηση για τη διάγνωση πιθανής αντισωματικής ανεπάρκειας [150].

Υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία που να συσχετίζουν τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών με τις αυτοάνοσες κυτταροπενίες. Η ΙΑΘ θεωρείται ολιγοκλωνική νόσος, ωστόσο υπάρχουν αναφορές που μιλάνε για πολυκλωνική επέκταση των Β κυττάρων. Η ανάπτυξη στο τομέα ανίχνευσης των αντι-αιμοπεταλικών αντισωμάτων anti Πb/ΠIa, οδήγησε σε περαιτέρω έρευνα πάνω στην μελέτη των αυτοαντισώματων. Τα αυτοαντισώματα είναι κυρίως IgG1, ωστόσο έχει βρεθεί ότι ασθενείς με IgG1,2,3 αυτοαντισώματα αναπτύσσουν πιο σοβαρή νόσο, ενώ η ανεύρεση IgG4 anti- Πb/ΠIa σχετίζεται με εμμένουσα μορφή και καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία [151].

Διαταραχές στα επίπεδα ανοσοσφαιρινών ορού έχουν συνδεθεί με σοβαρή κλινική νόσο και αντίσταση στη θεραπεία ασθενών με ΙΑΘ. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα IgA συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο αντίστασης στην πρώτη γραμμή θεραπεία και αιμορραγίας ανεξάρτητα του αριθμού των αιμοπεταλίων, ενώ χαμηλή IgM συνδέεται με χαμηλότερο αριθμό αιμοπεταλίων [152].

Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η τιμή των ανοσοσφαιρινών στη διάγνωση της ΙΑΘ διαφέρει ανάλογα τον τύπο της νόσου (οξεία, εμμένουσα, χρόνια) και μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της IgG τείνουν να είναι χαμηλά σε οξεία μορφή, επιστρέφουν σε φυσιολογικά επίπεδα σε αποδρομή της νόσου, ενώ παραμένουν σε σταθερά χαμηλά επίπεδα επί χρονίας μορφής [153][154].

Από την άλλη πλευρά, ο Masaru K. και συν. υποστηρίζουν σε αντίθεση με τις παραπάνω παρατηρήσεις ότι, οι τιμές των ανοσοσφαιρινών κατά τη διάγνωση τείνουν να είναι υψηλές σε οξεία μορφή της νόσου. Πιθανολογούνται δύο μηχανισμοί, πρώτον η υπερπαραγωγή αυτοαντισωμάτων και δεύτερον στη περίπτωση εκδήλωσης της νόσου μετά από λοίμωξη, μπορεί να οφείλεται στη χυμική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι του μικροβιακού ή ιικού παράγοντα [155][156].

Τέλος, σε άλλη μελέτη ο A. S. Khalifa και συν. μέτρησαν τις ανοσοσφαιρίνες ορού σε παιδιά με ΙΑΘ και παρατήρησαν ότι μειωμένες τιμές ανοσοσφαιρινών στην εμφάνιση της νόσου σχετίζονται με οξεία μορφή νόσου. Επιπλέον, μειωμένες τιμές IgA στη διάγνωση της νόσου συνδέεται με υποτροπιάζουσα και χρόνια ΙΑΘ [157][158].

Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών ως προς τη σχέση των επιπέδων των ανοσοσφαιρινών με τις αυτοάνοσες κυτταροπενίες. Ακόμη, δεν υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία που να μελετούν τα επίπεδα των υποτάξεων των ανοσοσφαιρινών στις αυτοάνοσες κυτταροπενίες. Στη μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι, ένα υψηλό ποσοστό (10,5%) ασθενών με αυτοάνοσες κυτταροπενίες και συγκεκριμένα ΙΑΘ και AAA είχαν εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG4 (sIgG4D). Οι εκλεκτικές ανεπάρκειες των ανοσοσφαιρινών εμφανίζονται στο 1-2% του πληθυσμού, ενώ η IgG4 μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμη στο 10% σε υγιή άτομα. Κατά κανόνα οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί με φυσιολογικά επίπεδα IgG, IgM, IgA και φυσιολογικές αντισωματικές απάντησεις, χωρίς ανάγκη θεραπείας. Οι συμπτωματικοί ασθενείς υποφέρουν από υποτροπιάζουσες λοιμώξεις ανωτέρου και κατωτέρου αναπνευστικού, ατοπία και αυτάνοσες εκδηλώσεις και ο φαινότυπος τους προσομοιάζει με των ασθενών με sIgAD [159][160].

Υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για τα αίτια των ανεπαρειών των υποτάξεων IgG. Μελέτη του εργαστηρίου μας έδειξε ότι ασθενείς με IgG4D, εμφανίζουν σε υψηλό ποσοστό μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* [161]. Επιπρόσθετα, τα TACI^{-/-} διαγονιδιακά

ποντίκια παρουσιάζουν μείωση σε όλες τις υποτάξεις της IgG, ύστερα από εμβολιασμό με θυμοανεξάρτητα αντιγόνα [162]. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τους Bachelli και συν. οι οποίοι έδειξαν ότι μοντέλα ποντικών με μετάλλαξη αντίστοιχη της C104R των ανθρώπων, παρουσίαζαν μείωση των υποτάξεων IgG2b, IgG1 ενισχύοντας της άποψη της επίδρασης του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* στην ανεπάρκεια των υποτάξεων της IgG [163]. Ο Morell διαπίστωσε ότι οι ανεπάρκειες των υποτάξεων της IgG, αποτελούν δείκτη σοβαρότερης νόσου του ανοσιακού συστήματος [164]. Βασιζόμενοι σε όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις επιλέξαμε να μελετήσουμε το γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* σε ασθενείς με αυτοάνοση κυτταροπενία και εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG4.

Οι εξελίξεις στην κατανόηση της παθογένειας τόσο της ΙΑΘ όσο και των υπόλοιπων αυτοάνοσων κυττοπενιών οδήγησε σε πληθώρα μελετών που διερευνούν τη μοριακή βάση αυτών των διαταραχών, καθώς και πιθανές αλλαγές στο γονότυπο που να επηρεάζουν το φαινότυπο. Γνωρίζουμε ότι στις αυτοάνοσες αιματολογικές διαταραχές διαταράσσεται τόσο η χυμική όσο και η κυτταρική ανοσία. Μελέτες συσχέτισης ανοσογονιδίων με την πρόγνωση αλλά και την παθογένεια της νόσου έδειξαν ότι η ΙΑΘ έχει σαφής μοριακή αιτιολογική βάση. Μελέτες σε επίπεδο έκφρασης ανοσογονιδίων έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών όπως IL-1, IL-6 και ο TNF στον ορό ασθενών με οξεία ΙΑΘ και χαμηλά επίπεδα IL-4 σε ασθενείς με χρόνια ΙΑΘ, υποδηλώνοντας ότι αποτελούν δύο διαφορετικές εκφάνσεις της ίδιας νόσου [165]. Μελέτες WES (whole exome sequencing) σε παιδιά με χρόνια ΙΑΘ, έδειξαν γενετικές βλάβες στο γονίδιο *IFNA17* το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκκριση του TGF-β καθώς και σε άλλα γονίδια (*DGCR14*, *SMAD2* και *CD83*) υπεύθυνα για τη λειτουργία των T κυττάρων. Δεδομένου ότι σε χρόνια ΙΑΘ, παρατηρείται εμμένουσα-χρόνια αυτοανοσία, επιβεβαιώνεται ότι γενετικές βλάβες σε ανοσογονιδια σχετίζονται με την πρόγνωση της νόσου [166]. Ακόμη, πολυμορφισμοί του γονιδίου *CTLA4* έχουν συσχετιστεί με την ιδιοπαθή αυτοάνοση θρομβοπενία [167]. Πολυμορφισμοί των γονιδίων των Fc υποδοχέων, της IL-1A και IL-1B καθώς και του TLR4, έχουν συσχετιστεί με την πρόγνωση της νόσου καθώς και με την ανταπόκριση στη θεραπεία [168][169][170].

Ο Emmerich και συν. έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός *TNFSF13B* (-871 T/C) σε ασθενείς με ΙΑΘ σχετίζεται με αυξημένη έκκριση του παράγοντα ενεργοποίησης B κυττάρων ορού (BAFF),

γεγονός που υποδηλώνει ότι η σηματοδότηση του κυτταρικού υποδοχέα TACI μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου [171].

Η ιδιοπαθής αυτοάνοση θρομβοπενία είναι σποραδική νόσος, ωστόσο σε ένα 2.2% των παιδιατρικών ασθενών αναφέρεται θετικό οικογενειακό ιστορικό [172]. Στη μελέτη των H.-L. Peng και συν. μελετήθηκε η πιθανότητα κληρονομικής βάσης της νόσου σε δύο αδέρφια με ΙΑΘ. Μέσω ελέγχου έκφρασης γονιδίων και WES (whole exome sequencing), ανιχνεύθηκε η gain-of- function μετάλλαξη G76S του γονιδίου *TNFRSF13B* σε ετερόζυγη μορφή, τόσο στα δύο αδέρφια όσο και στον πατέρα τους. Πρόκειται για μία μετάλλαξη που εντοπίζεται στην CDR2 περιοχή του υποδοχέα και οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης TACI, σε αύξηση της σύνδεσης του κυτταρικού υποδοχέα TACI με το συνδέτη APRIL και σε αύξηση κυττοκινών (BAFF, TNFα, IL-17) στον ορό ασθενών, ενώ οδηγεί σε απόπτωση των μεγακαρυοκυττάρων in vitro. Έτσι, η μετάλλαξη G76S, φάνηκε ότι αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση ΙΑΘ [173]. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες αποτελούν τη συχνότερη αιματολογική διαταραχή σε ασθενείς με CVID και εμφανίζονται στο 11-18% των ασθενών, με πιο συχνή την ΙΑΘ [174][175]. Επίσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* σχετίζονται με υψηλότερη επίπτωση λεμφοπεπλασίας και αυτοάνοσων κυτταροπενιών σε ασθενείς με CVID. Σε περιπτώσεις ΙΑΘ με διάγνωση CVID, εμφανίζονται πιο συχνά οι μεταλλάξεις C104R, A181E υποδηλώνοντας ότι γενετικές βλάβες στο ίδιο γονίδιο οδηγούν σε διαφορετικό φαινότυπο και παθογενετικό μηχανισμό.

Οι Jingyao Ma. και συν. προσπάθησαν μέσω NGS (next generation sequencing) να ανιχνεύσουν γενετικές βλάβες που μπορεί να προδιαθέτουν σε εμφάνιση CVID σε παιδιά με ανθεκτική ΙΑΘ, ως μέθοδο screening για την πρόιμη διάγνωση της CVID. Μελετήθηκαν 176 παιδιά και σε 16 από αυτά (9.1%) ανιχνεύθηκαν γενετικές βλάβες που σχετίζονται με τη CVID. Συγκεκριμένα, 5 ασθενείς εμφάνισαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI* [176].

Οι Maurizio Miano και συν. μελέτησαν την παρουσία γενετικών βλαβών σε ασθενείς με σ. Evans. Συμμετείχαν 40 ασθενείς, 18 από τους οποίους εμφάνισαν γενετικές βλάβες στα γονίδια *FAS*, *CASP10*, *TNFSF13B*, *LRBA*, *CTLA4*, *STAT3*, *IKBGK*, *CARD11*, *ADA2*, και *LIG4*. Συγκεκριμένα, σχεδόν οι μισοί ασθενείς με σ. Evans εμφάνισαν βλάβες σε ανοσογονίδια που σχετίζονται με ΠΑΑ, υποδεικνύοντας ότι οι διαταραχές αυτές μπορεί να έχουν ως υπόστρωμα πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια. [177].

Συνοψίζοντας, είναι σημαντικό να αναπτυχθούν μέθοδοι πρώιμης και έγκαιρης ανίχνευσης των ΠΑΑ, ιδιαίτερα σε νέους ασθενείς. Η IgG4 θα μπορούσε να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη για την καλύτερη εκτίμηση και παρακολούθηση ασθενών με αυτοάνοσες κυτταροπενίες. Για αυτό και συστήνουμε η μέτρηση της να γίνεται τη στιγμή της πρωτοδιάγνωσης της αυτοάνοσης αιματολογικής διαταραχής και σε περιπτώσεις με ανεπάρκεια της IgG4 συστήνουμε τακτική κλινικοεργαστηριακή εκτίμηση προς έγκαιρη διάγνωση πρωτοπαθούς αντισωματικής ανεπάρκειας. Ακόμη, ο έλεγχος γενετικών βλαβών σε αυτούς τους ασθενείς θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο. Έτσι, σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *TNFRSF13B/TACI*, ο τακτικός έλεγχος των ανοσοσφαιρινών και των υποτάξεων θα μπορούσε επίσης να συνεισφέρει στη διάγνωση αντισωματικής ανεπάρκειας.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη μας, διαπιστώσαμε υψηλό ποσοστό εκλεκτικής ανεπάρκειας της IgG4 σε ασθενείς με αυτοάνοσες κυτταροπενίες και ανιχνεύσαμε τη μετάλλαξη A181E του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* σε έναν ασθενή με ΙΑΘ και IgG4D. Η IgG4 θα μπορούσε να αποτελέσει βιοδείκτη για την καλύτερη εκτίμηση και παρακολούθηση της νόσου. Περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών καθώς και μετα-αναλύσεις απαιτούνται για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας.

Νόσος	Φύλο	Ηλικία διάγνωσης	Ιστορικό αυτοανοσίας	Οικογενειακό ιστορικό	τιμή IgG4	Μεταλλάξεις TAC1	Πολυρφισμοί TAC1 (SNPs)	introns variant
ITP (οξεία)	Άρρεν	5 ετών	όχι	όχι	1 mg/dl	wt/wt	wt/wt	wt
ITP (οξεία)	Άρρεν	16 ετών	όχι	όχι	0.28 mg/dl	p.A181E/wt	p.T27T/wt p.S277S/wt	A34625C-Heter
ITP (χρόνια)	Θήλυ	54 ετών	όχι	όχι	4.6 mg/dl	wt/wt	p.T27T/wt p.S277S/wt	A34625C-Heter
ITP (χρόνια)	Θήλυ	27 ετών	όχι	όχι	2.0 mg/dl	wt/wt	p.T27T/wt p.S277S/wt	A34625C-Heter
ITP (εμμένουσα)	Άρρεν	84 ετών	ναι (ΣΔ1)	όχι	1 mg/dl	wt/wt	p.T27T/wt p.S277S/wt	T33402G-Heter, T33482C-Heter
ITP (οξεία)	Θήλυ	21 ετών	όχι	CVID με μεταλλάξεις στο ΙΚΑΡΟΣ (ΚΟΡΗ)	1 mg/dl	wt/wt	wt/wt	wt/wt
AAA	Θήλυ	72 ετών	ναι (κνίδωση)	CVID (ΑΝΙΨΙΑ)	2.0 mg/dl	wt/wt	p.P251L/wt p.T27T/p.T27T	A34625C-Heter T33402G-Heter T33482C-Heter
AAA	Άρρεν	87 ετών	ναι (λεύκη)	όχι	2.0 mg/dl	wt/wt	p.T27T/wt	A34625C-Heter

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά των ασθενών με εκλεκτική ανεπάρκεια της IgG4

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Charlotte K, Brierley A, Sue Pavord, Autoimmune cytopenias and thrombotic thrombocytopenic purpura. Clinical Medicine. 2018
2. Christian P, Joseph d. Autoimmune Cytopenias: Diagnosis & Management, Advances in autoimmune diseases
3. David T. Teachey and Michele P. Lambert. Diagnosis and Management of Autoimmune Cytopenias in Childhood, *Pediatr Clin North Am.* 2013 December ; 60(6): 1489–1511. doi:10.1016/j.pcl.2013.08.009
4. Elebute M, Marsh J. Autoimmune cytopenias. *Medicine* 2009;37:159-163.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, Philadelphia, Saunders, 2012.
6. Johnsen J. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights . *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012 ; 2012 : 306 – 12
7. Saha M , McDaniel JK , Zheng XL . Thrombotic thrombocytopenic purpura: aetogenesis, diagnosis and potential novel therapeutics . *J Thromb Haemost* 2017 ; 15 : 1889 – 900 .
8. Nakhoul IN, Kozuch P, Varma M. Management of adult idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006;4(2):136-144.
9. Kaznelson P. [Verschwinden der h morrhagische Diathese bei einem Falle von “essentieller Thrombopenie” (Frank) nach Milzextirpation. Splenogene thrombolytische Purpura.] *Wein Klin Wochenschr* 1916;29:1451-1454.
10. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, et al. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951;38(1):1-10.
11. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113(11):2386-2393
12. Frederiksen H, Schmidt K. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood.* 1999; 94:909–13.
13. Schoonen WM, Kucera G, Coalson J, et al. Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database. *Br J Haematol.* 2009 Apr; 145(2):235-44.
14. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, et al. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood* 2009;113(26):6511-6521
15. Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, et al. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2001; 97(9):2549–54
16. Zeller B, Rajantie J, Hedlund-Treutiger I, et al. Childhood idiopathic thrombocytopenic purpura in the Nordic countries: epidemiology and predictors of chronic disease. *Acta Paediatr.* 94(2005):178–184
17. Pendaries C, Watson SP, Spalton JC. Methods for genetic modification of megakaryocytes and platelets. *Platelets* 2007; 18:393–408
18. Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, et al. Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med.* 1953; 38:433-469
19. Shulman NR, Weinrach RS, Libre EP, Andrews HL. The role of the reticuloendothelial system in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Trans Assoc Am Physicians.* 1965; 78:374-390.
20. McMillan R. The role of antiplatelet autoantibody assays in the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura. *Curr Hematol Rep.* 2005; 4:160-165
21. Tsubakio T, Tani P, Curd JG, McMillan R. Complement activation in vitro by antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 1986; 63:293-300.
22. McMillan R, Martin M. Fixation of C3 to platelets in vitro by antiplatelet antibody from patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 1981; 47:251-256.
23. Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2002; 346:995-1008
24. McMillan R; Wang L; Tomer A; Nichol J; Pistillo J; Suppression of in vitro Megakaryocyteroduction by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Oct 23]

25. Olsson B, Andersson PO, Jernås M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med.* 2003;9(9):1123-1124
26. Roark JH, Bussel JB, Cines DB, Siegel DL. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. *Blood.* 2002; 100:1388-1398
27. Stasi R, Del PG, Stipa E, et al. Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2007; 110:2924-2930.
28. Kuwana M, Ikeda Y. The role of autoreactive T-cells in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* 2005; 81:106-112.
29. Sukati H, Watson HG, Urbaniak SJ, Barker RN. Mapping helper T-cell epitopes on platelet membrane glycoprotein IIIa in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2007; 109:4528-4538.
30. Zhang F, Chu X, Wang L, et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 2006; 76:427-431.
31. Olsson B, Andersson PO, Jernås M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med.* 2003; 9:1123-1124.
32. Sakakura M, Wada H, Tawara I, et al. Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res.* 2007; 120:187-193.
33. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005; 115:3339-3347.
34. Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med.* 1998; 339:746-754.
35. Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood.* 1996; 87:4068-4071.
36. Kosar A, Haznedaroglu IC, Buyukasik Y, et al. Circulating thrombopoietin and interleukin-6 in newly diagnosed autoimmune versus aplastic thrombocytopenia. *Haematologica.* 1998; 83:1055-1056.
37. Koike Y, Yoneyama A, Shirai J, et al. Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemost.* 1998; 79:1106-1110.
38. Mukai HY, Kojima H, Todokoro K, et al. Serum thrombopoietin (TPO) levels in patients with amegakaryocytic thrombocytopenia are much higher than those with immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 1996; 76:675-678.
39. Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y, et al. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 1996; 93:704-706.
40. Heyns AD, Lotter MG, Badenhorst PN, et al. Kinetics and sites of destruction of ¹¹¹Indium-oxine-labeled platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura: a quantitative study. *Am J Hematol.* 1982; 12:167-177.
41. Ballem PJ, Segal GM, Stratton JR, et al. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest.* 1987; 80:33-40.
42. Stahl CP, Zucker-Franklin D, McDonald TP. Incomplete antigenic cross-reactivity between platelets and megakaryocytes: relevance to ITP. *Blood.* 1986; 67:421-428.
43. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2004; 103:500-506.
44. Olsson B, Ridell B, Carlsson L, Jacobsson S, Wadenvik H. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood.* 2008; 112:1078-1084.
45. Rolovic Z, Baldini M, Dameshek W. Megakaryocytopoiesis in experimentally induced immune thrombocytopenia. *Blood.* 1970; 35:173-188
46. van Leeuwen EF, van d, V, Engelfriet CP, von dem Borne AE. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood.* 1982; 59:23-26.
47. McMillan R, Tani P, Millard F, et al. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood.* 1987; 70:1040-1045

48. Braester A. Pseudothrombocytopenia as a pitfall in the treatment of essential thrombocythemia. *Eur J Haematol.* 2003;70(4):251-252
49. van Leeuwen EF, van d, V, Engelfriet CP, von dem Borne AE. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood.* 1982; 59:23-26.
50. Arnold DM, Nazy I, Clare R, et al. Misdiagnosis of primary immune thrombocytopenia and frequency of bleeding: lessons from the McMaster ITP Registry. *Blood Adv.* 2017;1(25):2414-2420.
51. Grimaldi-Bensouda L, Nordon C, Michel M, et al; Group for the PGRx-ITP Study. Immune thrombocytopenia in adults: a prospective cohort study of clinical features and predictors of outcome. *Haematologica.* 2016;101(9):1039-1045.
52. Mant MJ, Connolly T, Gordon PA, King EG. Severe thrombocytopenia probably due to acute folic acid deficiency. *Crit Care Med.* 1979;7(7):297-300
53. Mishra VA, Harbada R, Sharma A. Vitamin B12 and vitamin D deficiencies: an unusual cause of fever, severe hemolytic anemia and thrombocytopenia. *J Family Med Prim Care.* 2015;4(1):145-148.
54. Braester A. Pseudothrombocytopenia as a pitfall in the treatment of essential thrombocythemia. *Eur J Haematol.* 2003;70(4):251-252.
55. George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood.* 1996;88(1):3-40.
56. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *Br J Haematol.* 2003;120(4):574-596.
57. Scaradavou A, Woo B, Woloski BM, et al. Intravenous anti-D treatment of immune thrombocytopenic purpura: experience in 272 patients. *Blood.* 1997; 89(8):2689-2700
58. Kim KJ, Baek IW, Yoon CH, Kim WU, Cho CS. Thrombotic risk in patients with immune thrombocytopenia and its association with antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol.* 2013;161(5):706-714.
59. Pierrot-Deseilligny Despujol C, Michel M, Khellaf M, et al. Antiphospholipid antibodies in adults with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2008;142(4):638-643.
60. Altintas A, Ozel A, Okur N, et al. Prevalence and clinical significance of elevated antinuclear antibody test in children and adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Thrombolysis.* 2007;24(2):163-168.
61. Moulis G, Germain J, Comont T, et al; CARMEN Investigators Group. Newly diagnosed immune thrombocytopenia adults: clinical epidemiology, exposure to treatments, and evolution. Results of the CARMEN multicenter prospective cohort. *Am J Hematol.* 2017;92(6):493-500.
62. Liebman H. Other immune thrombocytopenias. *Semin Hematol.* 2007;44(4 suppl 5):S24-S34.
63. Provan D; Arnold DM; Bussell JB; Chong BH; Cooper N; Gernsheimer T; Ghanima W; Godeau B; González-López TJ; Grainger J; Hou M; Kruse (no date) Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia, *Blood advances.* Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31770441/> (Accessed: 28 December 2023).
64. Neylon AJ, Saunders PW, Howard MR, et al. Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults a prospective study of a population-based cohort of 245 patients. *Br J Haematol.* 2003; 122(6):966-974
65. Mazzucconi MG, Fazi P, Bernasconi S, et al. Therapy with high-dose dexamethasone (HD-DXM) in previously untreated patients affected by idiopathic thrombocytopenic purpura: a GIMEMA experience. *Blood.* 2007; 109(4):1401-1407.
66. Newland AC, Treleaven JG, Minchinton RM, Waters AH. High-dose intravenous IgG in adults with autoimmune thrombocytopenia. *Lancet.* 1983; 1(8316):84-87
67. Provan D, Stasi R, Newland A, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood.* 2010; 115(2):168-86.
68. Spahr JE, Rodgers GM. Treatment of immune-mediated thrombocytopenia purpura with concurrent intravenous immunoglobulin and platelet transfusion: a retrospective review of 40 patients. *Am J Hematol.* 2008; 83(2):122-125.

69. Packman CH. Hemolytic Anemia Resulting from Immune Injury. In: Kaushansky K, Lichtman M, Beutler E, Kipps T, Prchal J, Seligsohn U (eds.) *Williams Hematology*. New York: McGraw-Hill Medical; 2010:957-85
70. Michalak SS, Olewicz-Gawlik A, Rupa-Matysek J, Wolny-Rokicka E, Nowakowska E, Gil L. Autoimmune hemolytic anemia: Current knowledge and perspectives [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2020 [cited 2023 Nov 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7677104/>
71. Petz LD, Garratty G. Chapter 3 - Classification and Clinical Characteristics of Autoimmune Hemolytic Anemias. In: Petz LD, Garratty G (eds.) *Immune Hemolytic Anemias* (2nd ed.) Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004:61-131
72. Lechner K, Jager U. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. *Blood*. 2010;116(11):1831-8.
73. Petz LD, Garratty G: *Immune Hemolytic Anemias*, 2nd ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2004
74. Berentsen S: How I manage cold agglutinin disease. *Br J Haematol* 2011;153:309–317
75. Ahmad E, Elgohary T, Ibrahim H: Naturally occurring regulatory T cells and interleukins 10 and 12 in the pathogenesis of idiopathic warm autoimmune hemolytic anemia. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2011;21:297–304.
76. Barcellini W, Clerici G, Montesano R, Taioli E, Morelatti F, Rebulla P, Zanella A: In vitro quantification of anti-red blood cell antibody production in idiopathic autoimmune haemolytic anaemia: effect of mitogen and cytokine stimulation. *Br J Haematol* 2000;111:452–460
77. Audia S;Grienay N;Mounier M;Michel M;Bonnotte B; Evans' syndrome: From diagnosis to treatment [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Nov 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33260979/>
78. Buckley R. Primary Immunodeficiency Diseases due to defects in lymphocytes. *New England Journal of Medicine* 2000; 343: 1313-1324.
79. Roes S. Immunodeficiency Diseases presenting in adults-Diagnosis and Management. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2008; 21: 1-7.
80. Spickett G, Farrant J, North M, Zhang J, Morgan L, Webster D. Common Variable Immunodeficiency: How many diseases? *Immunology Today* 1997; 18:325-328.
81. Cunningham-Rundles C. The many faces of Common Variable Immunodeficiency. *Hematology* 2012:301-305.
82. Conley ME. Genetics of hypogammaglobulinemia: What do we really know? *Current Opinion in Immunology* 2009; 21: 466-471.
83. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, et al. Genes associated with Common Variable Immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *Journal of Medical Genetics* 2016; 53(9):575-590.
84. Lopes-Da-Silva S, Rizzo LV. Autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 2008; 28 (Suppl 1):S46–S55.
85. Aragon GJ, Jorgensen GH, Ludviksson BR. Primary immunodeficiency and autoimmunity: Lessons from human diseases. *Scandinavian Journal of Immunology* 2010; 71:317–328.
86. Parker AR;Skold M;Ramsden DB;Ocejo-Vinyals JG;López-Hoyos M;Harding S; The clinical utility of measuring IGG subclass Immunoglobulins during immunological investigation for suspected primary antibody deficiencies [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Nov 10]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29126302/>
87. French MA, Denis KA, Dawkins R, et al. Severity of infections in IgA deficiency: correlation with decreased serum antibodies to pneumococcal polysaccharides and decreased serum IgG2 and/or IgG4. *Clin Exp Immunol*. 1995;100(1):47-53.
88. Scadding GK, Lund VJ, Darby YC, et al. IgG subclass levels in chronic rhinosinusitis. *Rhinology*. 1994;32(1):15-19.
89. Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(5):1186-1205.e1.
90. Yount WJ, Seligmann M, Hong R, et al.: Imbalances of gamma globulin subgroups and gene defects in patients with primary hypogammaglobulinemia. *J Clin Invest* 1970, 49:1957–1966.

91. Abrahamian F, Agrawal S, Gupta S. Immunological and clinical profile of adult patients with selective immunoglobulin subclass deficiency: response to intravenous immunoglobulin therapy. *Clin Exp Immunol*. 2010;159(3):344-350
92. Barton JC, Bertoli LF, Barton JC. Comparisons of CVID and IgGSD: referring physicians, autoimmune conditions, pneumovax reactivity, immunoglobulin levels, blood lymphocyte subsets, and HLA-A and -B typing in 432 adult index patients. *J Immunol*. 2014;2014:542706
93. Schur PH, Borel H, Gelfand EW, et al.: Selective gamma-g globulin deficiencies in patients with recurrent pyogenic infections. *N Engl J Med* 1970, 283:631–634
94. Oxelius VA, Laurell AB, Lindquist B: IgG subclasses in selective IgA deficiency. *N Engl J Med* 1981, 304:1476–1477.
95. Oxelius VA, Berkel AI, Hanson LA: IgG2 deficiency in ataxiatelangiectasia. *N Engl J Med* 1982, 306:515–517.
96. Oxelius VA, Laurell AB, Lindquist B: IgG subclasses
97. Pan Q, Hammarström L. Molecular basis of IgG subclass deficiency. *Immunol Rev*. 2000;178:99-110
98. Tashita H, et al. Molecular basis of selective IgG2 deficiency. The mutated membranebound form of 2 heavy chain caused complete IgG2 deficiency in two Japanese siblings.
99. Morell A, Skvaril F, Steinberg AG, et al.: Correlations between the concentrations of the four sub-classes of IgG and Gm Allotypes in normal human sera. *J Immunol* 1972, 108(1):195–206.
100. Plebani A, Ugazio AG, Meini A, et al. Extensive deletion of immunoglobulin heavy chain constant region genes in the absence of recurrent infections: when is IgG subclass deficiency clinically relevant?
101. Ohta T. Role of gene duplication in evolution. *Genome* 1989;31:304–310.
102. Ohta T. Multigene families and the evolution of complexity. *J Mol Evol* 1991;33:34–41.
103. Pan Q, Lindersson Y, Sideras P, Hammarström L. Structural analysis of human 3 intervening regions and switch regions: implication for the low frequency of switching in IgG3-deficient patients. *Eur J Immunol* 1997;27:2920–2926.
104. Islam KB, Baskin B, Nilsson L, Hammarström L, Sideras P, Smith CI. Molecular analysis of IgA deficiency. Evidence for impaired switching to IgA. *J Immunol* 1994;152:1442–1452.
105. Wang Z, et al. Discordance between IgA switching at the DNA level and IgA expression at the mRNA level in IgA-deficient patients. *Clin Immunol* 1999;91:263–270
106. Wochner RD, Drews G, Strober W, Waldmann TA. Accelerated breakdown of immunoglobulin G (IgG) in myotonic dystrophy: a hereditary error of immunoglobulin catabolism. *J Clin Invest* 1966;45:321–329.
107. Waldmann TA. Disorders of immunoglobulin metabolism
108. Migone N, Oliviero S, de Lange G, et al.: Multiple gene deletions within the human immunoglobulin heavy-chain cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, 81:5811–815.
109. Oxelius VA: Serum IgG and IgG subclass contents in different Gm phenotypes. *Scand J Immunol* 1993, 7(2):149–153.
110. Sarvas H, Rautonen N, Makela O: Allotype-associated differences in concentrations of human IgG subclasses. *J Clin Immunol* 1991, 11:39–45
111. Morell A, Skvaril F, Steinberg AG, et al.: Correlations between the concentrations of the four sub-classes of IgG and Gm Allotypes in normal human sera. *J Immunol* 1972, 108(1):195–206.
112. French M: Serum IgG subclasses in normal adults. *Monogr Allergy* 1986, 19:100–107.
113. RH; B. Immunoglobulin G subclass deficiency: Fact or fancy? [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Nov 10]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12165200/>
114. Bram RJ, Crabtree GR. Calcium signaling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* 1994; 371: 355-358.
115. Shaw CJ, Lupski JR. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Hum Genet* 2005; 116: 1-7
116. BODMER JL, SCHNEIDER P, TSCHOPP J. The molecular architecture of the TNF superfamily *Trends Biochem Sci* 2002, 27:19-26
117. Gross ja, johnston j, mudri s, enselman r, dillon sr, madden k, xu w, parrish-novak j, foster

117. D, lofton-day c, moore m, littau a, grossman a, haugen h, foley k, blumberg h, harrison k, kindsvogel w, clegg ch. taci and bcma are receptors for a tnf homologue implicated in bcell autoimmune disease nature 2000, 404:995-999
118. Vugmeyster y, seshasayee d, chang w, storn a, howell k, sa s, nelson t, martin f, grewal i, gilkerson e, wu b, thompson j, ehrenfels bn, ren s, song a, gelzleichter tr, danilenko dm. a soluble baff antagonist, br3-fc, decreases peripheral blood b cells and lymphoid tissue marginal zone and follicular b cells in cynomolgus monkeys am j pathol 2006, 168:476-489
119. Dillon sr, gross ja, ansell sm, novak aj. an april to remember: novel tnf ligands as therapeutic targets nat rev drug discov 2006, 5:235-246
120. Dillon sr, harder b, lewis kb, moore md, liu h, bukowski tr, hamacher nb, lantry mm, maurer m, krejsa cm, ellsworth jl, pederson s, elkon kb, wener mh, dall'era m, gross ja. blymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacicept and b-cell maturation antigen-immunoglobulin arthritis res ther 2010, 12:r48
121. Thompson js, bixler sa, qian f, vora k, scott ml, cachero tg, hession c, schneider p, sizing idmullen c, strauch k, zafari m, benjamin cd, tschopp j, browning jl, ambrose c. baff-r, a newly identified tnf receptor that specifically interacts with baff science 2001, 293:2108-2111
122. Kimberley fc, van bostelen l, cameron k, hardenberg g, marquart ja, hahne m, medema jp. the proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of april serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking faseb j 2009, 23:1584-1595
123. Guerassimov a, zhang y, banerjee s, cartman a, webber c, esdaile j, fitzcharles ma, poole ar. autoimmunity to cartilage link protein in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis j rheumatol 1998, 25:1480-1484
124. Bacchelli c, buckridge s, thrasher aj, gaspar hb. translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency clin exp immunol 2007, 149:401-409
125. Zhang Y; Li J; Zhang YM; Zhang XM; Tao J; Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25866827/>
126. Salzer, et al. TACI deficiency - a complex system out of balance [Internet]. Elsevier Current Trends; 2021 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791521000728>
127. KP; XS. Transmembrane Activator and Caml Interactor (TACI): Another potential target for immunotherapy of multiple myeloma? [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32340409/>
128. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, Peter HH, Rockstroh JK, Schneider P, Schäffer AA, Hammarström L, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. Nat Genet 2005; 37: 820-828.
129. Mohammadi J, Liu C, Aghamohammadi A, Bergbreiter A, Du L, Lu J, Rezaei N, mirzargar AA, Moin M, Salzer U, Pan-Hammarström Q, Hammarström L. Novel mutations in TACI (TNFRSF13B) causing common variable immunodeficiency. J Clin Immunol 2009; 29: 777-785.
130. Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, et al. Reexamining the role of TACI coding variants in Common Variable Immunodeficiency and Selective IgA Deficiency. Nature Genetics 2007; 39:429-430.
131. Castigli E, Wilson S, Garibyan L, et al. Reexamining the role of TACI coding variants in Common Variable Immunodeficiency and Selective IgA Deficiency. Nature Genetics 2007; 39:430-431.
132. Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, et al. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). Journal of Clinical Investigation 2007; 117:1550-1557.
133. Lee JJ, Jabara HH, Garibyan L, et al. The C104R mutant impairs the function of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) through haploinsufficiency. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2010; 126:1234-1241.

134. Speletas M, Mamara A, Iordanakis G, et al. TACI expression and mutational status in Greek patients with Common Variable Immunodeficiency and Selective IgA Deficiency. *European Journal of Immunology* 2009; 39:S457.
135. Tobon GJ, Izquierdo JH, Canas CA. B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Diseases* 2013; 2013:827254.
136. Zhang Y, Li J, Zhang YM, et al. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. *Journal of Immunology Research* 2015; 2015:247426.94) Bischof D, Elswa SF, Mantchev G, et al. Selective activation of TACI by syndecan-2. *Blood* 2006; 107:3235-3242
137. Speletas M, Salzer U, Florou Z et al. Heterozygous alterations of TNFRSF13B/TACI in Tonsillar Hypertrophy and Sarcoidosis. *Clinical and Developmental Immunology*, Volume 2013, Article ID: 532437.
138. Salzer U, Birmelin J, Bacchelli C et al. Sequence analysis of TNFRSF13b, encoding TACI, in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Clinical Immunology* 2007; 27: 372-377.
139. Salzer U, Bacchelli C, Buckridge S, Pan-Hammarström Q, Jennings S, Lougaris V, Bergbreiter A, Hagena T, Birmelin J, Plebani A, Webster AD, Peter HH, Suez D, Chapel H, McLean-Tooke A, Spickett GP, Anover-Sombke S, Ochs HD, Urschel S, Belohradsky BH, Ugrinovic S, Kumararatne DS, Lawrence TC, Holm AM, Franco JL, Schulze I, Schneider P, Gertz EM, Schäffer AA, Hammarström L, Thrasher AJ, Gaspar HB, Grimbacher B. Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing diseasecausing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood* 2009; 113: 1967-1976.
140. Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominantnegative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Invest* 2007 ;117: 1550-1557.
141. Conley ME. Genetics of hypogammaglobulinemia: what do we really know? *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 466-471.
142. Speletas M;Mamara A;Papadopoulou-Alataki E;Iordanakis G;Liadaki K;Bardaka F;Kanariou M;Germeris AE; TNFRSF13B/TACI alterations in greek patients with antibody deficiencies [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21547394/>
143. Yan M, Wang H, Chan B, Roose-Girma M, Erickson S, Baker T, Tumas D, Grewal IS, Dixit VM. Activation and cumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol* 2001; 2: 638-643.
144. Pan-Hammarstrom Q, Salzer U, Du L, Björkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL, et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet*2007;39(4):429-430.
145. Pulvirenti F, Zuntini R, Milito C, Specchia F, Spadaro G, Danieli MG, et al. Clinical associations of biallelic and monoallelic TNFRSF13B variants in Italian primary antibody deficiency syndromes. *J Immunol Res* 2016;2016: 8390356.
146. Martinez-Gallo M, Radigan L, Almejún MB, MartínezPomar N, Matamoros N, Cunningham-Rundles C. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(2):468-476.
147. Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity* 2003; 18: 279–88
148. Γερμενής ΑΕ. Διαγνωστική Ανοσολογία. Εκδόσεις Παπαζήση 2000, σελ 16-18
149. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, et al. TNFRSF13B/TACI alterations in Greek patients with antibody deficiencies. *Journal of Clinical Immunology* 2011; 31: 50-559.
150. Provan D;Arnold DM;Bussel JB;Chong BH;Cooper N;Gernsheimer T;Ghanima W;Godeau B;González-López TJ;Grainger J;Hou M;Kruse C;McDonald V;Michel M;Newland AC;Pavord S;Rodeghiero F;Scully M;Taniyama Y;Wong RS;Zaja F;Kuter DJ; Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Dec 19]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31770441/>

151. Chan H;Moore JC;Finch CN;Warkentin TE;Kelton JG; The IGG subclasses of platelet-associated autoantibodies directed against platelet glycoproteins iib/iiia in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Dec 19]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12930395/>
152. . Arnason JE, Campigotto F, Neuberg D, Bussel JB. Abnormalities in IGA and IGM are associate with treatment-resistant ITP [Internet]. American Society of Hematology; 2012
153. Khalifa AS, Lusher JM, Cejka J, Zuelzer WW. Immunoglobulins in idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Acta Haematologica*. 1976;56(4):205–11. doi:10.1159/000207939
154. Fatma EbeidSE, Ahmed K, Nihal E-K, Salwa H. Cytokines and immunoglobulin derangement in Egyptian children with primary immune thrombocytopenic purpura. *The Egyptian Journal of Haematology*. 2018;43(1):1. doi:10.4103/ejh.ejh_37_17
155. Kubota M, Adachi S, Usami I, Okada M, Kitoh T, Shiota M, et al. Characterization of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in Japanese children: A retrospective multi-center study. *International Journal of Hematology*. 2010;91(2):252–7. doi:10.1007/s12185-009-0484-1
156. Kubota M, Usami I, Kobayashi K, Tsutsui T, Matsubara K. Serum immunoglobulin levels at onset: Association with the prognosis of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *International Journal of Hematology*. 2003;77(3):304–7. doi:10.1007/bf02983791
157. Immunoglobulins in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Childhood
158. Gandolfo GM, Afeltra A, De Ruggieri MA, Hernandez MA. Determination of serum immunoglobulins in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematologica*. 1981;66(2):113–6. doi:10.1159/000207107
159. Buckley RH. Immunoglobulin G subclass deficiency: Fact or fancy? *Current Allergy and Asthma Reports*. 2002;2(5):356–60. doi:10.1007/s11882-002-0067-1
160. Fried AJ, Bonilla FA. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(3):396–414. doi:10.1128/cmr.00001-09
161. Speletas M, Mamara A, Papadopoulou-Alataki E, Iordanakis G, Liadaki K, Bardaka F, et al. TNFRSF13B/TACI alterations in greek patients with antibody deficiencies. *Journal of Clinical Immunology*. 2011;31(4):550–9. doi:10.1007/s10875-011-9536-4
162. Bacchelli C, Buckland KF, Buckridge S, Salzer U, Schneider P, Thrasher AJ, Gaspar HB. The C76R transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor
163. Bacchelli C;Buckland KF;Buckridge S;Salzer U;Schneider P;Thrasher AJ;Gaspar HB; The C76R transmembrane activator and Calcium Modulator Cyclophilin Ligand interactor mutation disrupts antibody production and B-cell homeostasis in heterozygous and homozygous mice [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2024 Feb 6]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21458042/>
164. Morell A. Clinical relevance of IgG subclass deficiencies. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994; 52: 49-52.
165. M, Hou Y, Strömberg Célind F, Shao L, Nookaew I, Wang Q, et al. Differences in gene expression and cytokine levels between newly diagnosed and chronic pediatric ITP [Internet]. American Society of Hematology; 2013 [cited 2023 Dec 18].
166. Author links open overlay panelJenny M. Despotovic et al. Genes influencing the development and severity of chronic ITP identified through whole exome sequencing [Internet]. Content Repository Only!; 2021
167. Chen D-P, Lin W-T, Wen Y-H, Wang W-T. Investigation of the correlation between immune thrombocytopenia and T cell activity-regulated gene polymorphism using functional study [Internet]. Nature Publishing Group; 2022
168. Yadav DK;Tripathi AK;Gupta D;Shukla S;Singh AK;Kumar A;Agarwal J;Prasad KN; Interleukin-1B (IL-1B-31 and IL-1B-511) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene polymorphisms in primary immune thrombocytopenia [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Dec 18]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29333402/>
169. David E. Schmidt,1,2,* Katja M. J. Heitink-Polle, Transient and chronic childhood immune thrombocytopenia are distinctly affected by Fc-g receptor polymorphisms,Blood 2019
170. Taylor Olmsted Kim Jonathan M. Flana Ali Habibi1Genetic variants in toll-like receptor 4 are associated with lack of steroid-responsiveness in pediatric ITP patients,Wiley 2019

171. Emmerich F, Bal G, Barakat A, Milz J, Muhle C, MartinezGamboa L, Dorner T, Salama A. High-level serum B-cellactivating factor and promoter polymorphisms in patients withidiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007; 136:309–14.
172. Rischewski JR, Imbach P, Paulussen M, Kuhne T. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): is there a genetic predisposition? *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47: 678–80.
173. Peng H -L., Zhang Y, Sun N -N., Yin Y -F., Wang Y -W., Cheng Z, et al. A gain-of-function mutation in TNFRSF13B is a candidate for predisposition to familial or sporadic immune thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017;15(11):2259–69. doi:10.1111/jth.13806
174. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. (2012) 119:1650–7. doi: 10.1182/blood-2011-09-3779459.
175. Gathmann B, Mahlaoui N, Gérard L, Oksenhendler E, Warnatz K, SchulzeI, et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J Allerg*
176. Ma J;Fu L;Gu H;Chen Z;Zhang J;Zhao S;Zhu X;Liu H;Wu R; Screening for genetic mutations for the early diagnosis of common variable immunodeficiency in children with refractory immune thrombocytopenia: A retrospective data analysis from a tertiary children's center [Internet]. U.S. National Library of Medicine;
177. Miano M, Guardo D, Grossi A, Palmisani E, Fioredda F, Terranova P, et al. Underlying inborn errors of immunity in patients with Evans syndrome and multilineage cytopenias: A single-centre analysis [Internet]. *Frontiers*;